

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM CAMPO
MAGNÉTICO PULSADO SOBRE A CICATRIZAÇÃO
CUTÂNEA E BIOMARCADORES OXIDATIVOS EM
RATOS *WISTAR***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jéssica Franco Dalenogare

Santa Maria, RS, Brasil

2015

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM CAMPO MAGNÉTICO PULSADO SOBRE A CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA E BIOMARCADORES OXIDATIVOS EM RATOS *WISTAR*

Jéssica Franco Dalenogare

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Farmacologia Aplicada à toxicologia e nutracêutica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Amália Pavanato

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Izabel U. M. Rocha

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM CAMPO MAGNÉTICO PULSADO
SOBRE A CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA E BIOMARCADORES
OXIDATIVOS EM RATOS *WISTAR***

Elaborada por
Jéssica Franco Dalenogare

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Maria Amália Pavanato, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Maria Izabel U. M. Rocha, Dr^a.
(Co-orientador)

Alex Sander Araujo, Dr.
(UFRGS)

Liliane Bauermann Dr^a.
(UFSM)

Santa Maria, 14 de agosto de 2015.

*Dedico este trabalho e todo meu amor aos meus pais
José e Leda, por serem o meu apoio e a
minha base, sem eles nada teria sido possível*

.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a permissão de chegar até aqui, e por toda a força concedida na concretização desse sonho. Além disso, agradeço a Ele por todas as pessoas que cruzaram meu caminho e que estão aqui citadas, todas muito especiais.

A minha orientadora, Prof^ª Maria Amália Pavanato, o meu sincero agradecimento pela orientação, confiança, carinho, amizade e por todos os ensinamentos durante essa fase de amadurecimento pessoal e profissional.

A minha co-orientadora Prof^ª Maria Izabel U. M. Rocha, Prof. Marcelo Leite da Veiga e Prof^ª Cristina da Costa, pelos anos de convívio e amizade, pelos ensinamentos, ajudas e incentivo. Obrigada por acreditarem em mim e estarem ao meu lado, o carinho e apoio de vocês foram marcantes nessa trajetória.

Ao Prof. Alex Araujo, Prof^ª. Liliane Bauermann e Prof Luiz Carlos Kucharski por aceitarem participar da banca de defesa desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram para minha formação.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

Aos queridos colegas de laboratório (Labfox e Labitex) pelo auxílio nos experimentos, pela partilha de conhecimentos, disponibilidade, companheirismo, amizade, dedicação e pelos momentos de alegria e descontração.

Aos meus pais, José e Leda, minha base, meu exemplo, pelo amor incondicional, por tudo o que sou, por me proporcionarem educação e me estimularem a continuar.

A meu irmão, Diego, pelo amor, cuidado e incentivo.

A toda minha família, pelo apoio e suporte para a realização deste e tantos outros sonhos.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta Dissertação de Mestrado.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela oportunidade de realização deste curso.

A todos, muito obrigada!

“Se as coisas são inatingíveis... Ora, não é motivo para não querê-las... que tristes os caminhos se não fora a presença distante das estrelas...”.

Mário Quintana

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

AValiação dos Efeitos de um Campo Magnético Pulsado Sobre a Cicatrização Cutânea e Biomarcadores Oxidativos em Ratos Wistar

AUTORA: Jéssica Franco Dalenogare
ORIENTADORA: Dr^a. Maria Amália Pavanato
CO-ORIENTADORA: Dr^a. Maria Izabel U. M. Rocha
Data e local da defesa: Santa Maria, 14 de agosto de 2015.

O pós-operatório cirúrgico requer uma cicatrização rápida, efetiva e de boa qualidade do tecido cicatrizado. Dessa forma, têm-se buscado alternativas para auxiliar o reparo tecidual e melhorar o aspecto da região cicatrizada. Os campos magnéticos pulsados são uma dessas alternativas, sendo capazes de acelerar o processo de cicatrização. A exposição a campos magnéticos pulsados podem alterar a homeostase redox do tecido. Essa alteração é dependente da intensidade, frequência e tempo de exposição. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo verificar a efetividade do campo magnético pulsado (23 mT, frequência de 62Hz), 30 minutos por dia, durante 14 dias, na cicatrização de pele em ratos *Wistar* machos. Assim como, analisar se o campo magnético pulsado nos parâmetros determinados pode causar alterações no equilíbrio oxidativo. Os animais passaram por uma cirurgia de remoção de pele. Essa cirurgia consistiu na remoção de 1cm² de pele no dorso de cada animal. Após, os animais foram separados em grupo controle e grupo tratado com campo magnético. Ao término do experimento, foi realizada análise histológica (regeneração epidérmica, regeneração dérmica, infiltração de fibroblastos, infiltrado inflamatório e angiogênese), índice de fechamento da ferida, ensaio de tração, atividade da mieloperoxidase na pele e os biomarcadores do estresse oxidativo (substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e o conteúdo dos grupos tióis não proteicos (NPSH) na pele e no fígado, em diferentes tempos (3, 7 e 14 dias). Esse estudo demonstrou que o tratamento com campo magnético pulsado, nas configurações específicas utilizadas, aumentou o índice de fechamento da ferida, melhorou as regenerações epidérmica e dérmica, aumentou a infiltração de fibroblastos e angiogênese, e a resistência a tração da pele cicatrizada. Também foi evidenciado uma redução da infiltração inflamatória, bem como na atividade da mieloperoxidase. Além disso, foi demonstrado que o campo magnético reduziu os níveis de TBARS e não gerou estresse oxidativo nessas condições. Em conclusão, o tratamento proposto auxilia a cicatrização de pele, melhora a condição do tecido cicatrizado e não promove danos oxidativos.

Palavras-chave: Campo magnético pulsado; cicatrização de feridas; pele; antioxidantes; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduating in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF THE EFFECTS OF A PULSED MAGNETIC FIELD ON SKIN HEALING AND OXIDATIVE BIOMARKERS IN *WISTAR* RATS

AUTHOR: Jéssica Franco Dalenogare
ADVISER: Dr^a. Maria Amália Pavanato
CO-ADVISER: Dr^a. Maria Izabel U.M.Rocha
Date and place of defense: August 14, 2015, Santa Maria.

The surgical postoperative period requires rapid, effective and good-quality wound repair. For a better cicatrization process alternatives have been sought to assist wound repair and improve the appearance of scarred region. Pulsed magnetic fields are an alternative to accelerate the healing process. Treatment with pulsed magnetic fields can change the redox homeostasis of the tissue. Redox homeostasis variation depends on the intensity, frequency and duration of exposure. This study aimed to verify the effectiveness of the pulsed magnetic field (23 mT, frequency 62Hz), 30 minutes per day for 14 days, in the wound repair in male Wistar rats. As well, analyse if pulsed magnetic field parameters used can cause alteration in the oxidative equilibrium in those animals. The animals were submitted to a skin removal surgery. The surgery consisted of removing 1cm² of skin located on the middle of the back of each animal. The experiment were performed on 2 groups of animals: a control group and a group treated with a pulsed magnetic field. After the experiment, histological parameters (epidermal regeneration, dermal regeneration, fibroblast infiltration, inflammatory infiltrate and angiogenesis), the wound contraction, tensile strength, myeloperoxidase activity was analysed in the skin. Thus, biomarkers of oxidative stress (thiobarbituric reactive substances (TBARS), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), and content of non-protein thiol groups (NPSH) was analysed in the skin and liver. All those analyses were made in different times (days 3, 7 and 14). This study demonstrated that exposing wounds to pulsed magnetic field of specific configurations enhanced wound healing in this animal model, as evidenced by significantly increased of the wound contraction, improved the epidermal and dermal regeneration, increased infiltration of fibroblasts and angiogenesis and increased wound tensile strength. It was also evidenced reduction in inflammatory infiltration and myeloperoxidase activity. It was shown that the pulsed magnetic field reduced the TBARS levels, and did not cause oxidative stress under these pulsed magnetic field conditions. In conclusion, the proposed treatment assists the wound healing, improves the condition of the scarred skin and does not promote oxidative damage.

Keywords: Pulsed magnetic field; wound healing; skin; antioxidants; oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura da pele	18
Figura 4- Fases da cicatrização	22
Figura 3- Formação das ROS a partir da redução parcial do oxigênio	23
Figura 4- Remoção das ROS pelas enzimas antioxidantes	27

LISTA DE TABELAS

Table 1- Histological parameters in the skin 48

Table 2- Biomarkers of oxidative stress in the skin 49

Table 3- Biomarkers of oxidative stress in the liver..... 50

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1- Schematic diagram of the magnetic field application system, composed by the pair of solenoids and core Ferro-Silicon, which form the electromagnet and the source of pulsed voltage. Region "A" indicates where the animals were confined under the action of the magnetic field 51
- Figure 2- Magnetic field in the region between the poles of the electromagnet. In the region limited by the yellow color variation of the magnetic field is not greater than 10%. It is in this region where the animals were exposed to the field 52
- Figure 3- Photomicrograph of damaged skin. The arrow indicates the presence of epithelium, "C" corresponds to crust, "f" fibrin and "d" dermis (Goldner X40)53
- Figure 4- Wound contraction. Values are represented as the man \pm SEM. * Indicates significant differences from the control group at the same time ($P < 0.05$). Different lowercase letters indicate significant differences between times at the same treatment ($P < 0.05$).54
- Figure 5- Tensile strength of skin. Values are represented as the man \pm SEM. * Indicates significant differences from the control group ($P < 0.05$)55
- Figure 6- Myeloperoxidase activity. Values are represented as the man \pm SEM. * Indicates significant differences from the control group at the same time ($P < 0.05$). Different lowercase letters indicate significant differences between times at the same treatment ($P < 0.05$)56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>reactive oxygen species</i>)
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GST	Glutathiona-S-transferase
GSH	Glutathiona reduzida
PDGF	Fator de crescimento de plaquetas
TGF- β	Fator de crescimento transformante
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
OH [•]	Radical hidroxil
H ₂ O	Água
RL	Radicais livres
¹ O ₂	Oxigênio singlete
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
LPO	Lipoperoxidação (<i>lipid peroxidation</i>)
MDA	Malondialdeído
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos (<i>lipid hydroperoxide</i>)
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GSSG	Glutathiona oxidada
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto-2

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 Pele	16
1.2 Processo de cicatrização	19
1.2.1 Fase inflamatória	19
1.2.2 Fase de proliferação	20
1.2.3 Fase de remodelação tecidual	21
1.3 O balanço oxidativo	23
1.3.1 Espécies reativas de oxigênio	23
1.3.2 Estresse oxidativo	25
1.3.3 Sistema de defesa antioxidante	26
1.4 Campo magnético na cicatrização e no balanço oxidativo	28
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3 MANUSCRITO	33
4 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58

INTRODUÇÃO

A pele é responsável pela proteção e revestimento externo do organismo. Dessa forma, ela possui variadas funções, atuando na barreira contra agentes físicos e químicos, na regulação térmica, contra invasão de microrganismos estranhos, proteção contra radiação ultravioleta, e na regulação da pressão sanguínea (JACOB; FRANCONI; LOSSOW, 1990).

O rompimento da continuidade normal da estrutura da pele caracteriza a lesão dérmica. Essa lesão pode ocorrer por agentes físicos, químicos ou biológicos, porém, todo organismo conta com uma capacidade de auto-regeneração, atuando na cicatrização desse ferimento, fator imprescindível para a sobrevivência (RUSHTON, 2007; BORGES, 2008). O processo cicatricial envolve uma série de eventos que representam a tentativa de restabelecer a estrutura anatômica e função normal do tecido lesionado (OLSSON et al, 2008).

No processo de cicatrização estão envolvidas as fases de formação de coágulo e inflamação, formação de tecido novo ou fase proliferativa e fase de remodelação tecidual. O dano tecidual acarreta a formação do coágulo e o tampão plaquetário, que inicialmente selam a ferida, e em conjunto, as células inflamatórias migram ao local da lesão e realizam a defesa contra bactérias. A reepitelização é dada a partir da proliferação de queratinócitos nas extremidades da ferida juntamente com a migração, multiplicação e depósito de fibroblastos na matriz extracelular, constituindo a formação de tecido novo. A reepitelização tecidual é concluída na fase de remodelação tecidual, onde o tecido de granulação é gradualmente reduzido e a matriz extracelular é remodelada (SCHÄFER; WERNER, 2008).

Em todas estas fases do processo de cicatrização da pele, as espécies reativas de oxigênio (ROS) podem estar envolvidas (WLASCHEK; SCHARFFETTER-KOCHANEK, 2005). Em baixas concentrações as ROS e os seus subprodutos, tais como os metabólitos da oxidação de proteínas e lipídios, estão envolvidos nas vias de transdução de sinal intracelular e regulação de expressão gênica podendo determinar a resposta anti-inflamatória, crescimento celular, diferenciação, proliferação e resposta ao estresse (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL, 2001; NAKASHIMA et al, 2003;). No entanto, quando há um aumento excessivo na formação da ROS, excedendo a capacidade das células de detoxificação, favorecendo os processos prooxidantes, ocorre o que se denomina estresse oxidativo, sendo este prejudicial, ocasionando danos em macromoléculas como proteínas, lipídios e DNA (SIES, 1985). Além disso, o estresse oxidativo está relacionado na patogênese de ferimentos de difícil cicatrização (SCHÄFER; WERNER, 2008).

Para prevenir e impedir os efeitos deletérios das ROS, a pele assim como os outros tecidos, desenvolveram um sistema de defesa como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), e também, defesas antioxidantes não enzimáticas como a glutathione (GSH), entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Devido à complexidade do processo cicatricial, métodos alternativos têm sido investigados, para melhorar a efetividade de tratamentos. Entre estes, encontra-se a utilização de campos magnéticos, os quais possuem influência sobre vários aspectos da fisiologia. O organismo é movido através de uma constante formação de energia biomagnética pelos fatores bioquímicos, fluidos celulares, atividade física, mental e a própria atividade celular. Assim, é compreensível a aplicação de campos magnéticos no tratamento de enfermidades, por ter como consequência, trocas com o potencial biomagnético do organismo. Com isso, são produzidos efeitos benéficos em processos fisiológicos como o de cicatrização de pele, mediante controle do fluxo sanguíneo, controle humoral e propriedades anti-inflamatórias (ÁLVARES; GARCÍA; BLANCO, 2007).

Dessa forma, os campos magnéticos têm se mostrado como uma proposta potencial na terapia de cicatrização de feridas (PEREZ, 2002). Porém, sua atuação no balanço redox ainda é controversa na literatura, havendo relatos de que os mesmos poderiam ocasionar danos oxidativos (SHALABY; SHAWKI, 2006; HASHISH et al., 2008; EMRE et al., 2011). Entretanto, já foi abordado que baixos valores de campos magnéticos, com exposição de 30 minutos, não causam esse prejuízo (GORAKA et al., 2010).

Tendo em vista o que foi exposto, o presente estudo teve como objetivo verificar a efetividade do campo magnético pulsado (23 mT, frequência de 62Hz), 30 minutos por dia, durante 14 dias, na cicatrização de pele em ratos *Wistar* machos. Assim como, analisar se o campo magnético pulsado nos parâmetros determinados pode causar alterações no equilíbrio oxidativo.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo ela responsável pela proteção e revestimento externo do organismo. Sua espessura varia de 0,5 a 4 mm, recobrando uma superfície superior a 20.000 cm² e pesando cerca de 3,6 kg (excluindo gordura) em um adulto médio. A pele possui variadas funções, atuando na barreira contra agentes físicos e químicos, na regulação térmica, contra invasão de microrganismos estranhos, proteção contra radiação ultravioleta, e na regulação da pressão sanguínea (JACOB; FRANCONI; LOSSOW, 1990;).

Além disso, a pele é também um componente periférico do sistema imune, tendo a capacidade de desencadear uma resposta imune primária frente a um patógeno. Assim, a pele apresenta-se como um órgão complexo com diversos tipos celulares e estruturas, estando divididos em três camadas principais, que correspondem a epiderme mais externamente, seguida da derme e mais profundamente a hipoderme, a qual é a camada de tecido adiposo (SPELLBERG, 2000; DEBENEDICTIS et al., 2001; MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007) (Figura 1).

Por ser a camada mais externa, a epiderme é a responsável pela proteção contra traumas mecânicos, entrada de agentes estranhos que sejam patogênicos, e impedir a perda de água (DENNING, 2004; MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007). Ela é caracterizada como um epitélio estratificado pavimentoso que se constitui por cinco camadas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e camada córnea. As principais células encontradas na epiderme são os queratinócitos, os quais surgem da camada basal e vão migrando através das sucessivas camadas enquanto realizam sua diferenciação. Ao se aproximarem da superfície, na camada córnea, os queratinócitos têm sua morfologia alterada, não apresentando mais núcleo, assim morrem e descamam, sendo substituídos por novas células que já vinham migrando e se diferenciando, sendo esse um processo constante, fazendo da epiderme uma estrutura dinâmica (GNIADOCKI, 1998; GARTNER; HIATT, 1999).

Além dos queratinócitos, também são encontradas outras células como os melanócitos, que são os responsáveis pela produção do pigmento da pele, as células de Langerhans, as

quais são células apresentadoras de antígenos (DENNING, 2004) e próximo a essas alguns linfócitos T, sendo esses, normalmente células de memória (SPELLBERG, 2000).

A epiderme é avascular, dessa forma, encontra-se apoiada a derme através de uma lâmina basal, sendo então, a derme responsável pelo aporte sanguíneo da epiderme. Com isso, dentre as funções da derme está o suprimento de nutrientes necessários para a epiderme, assim como também, realizar a termo regulação. Além disso, as células presentes na derme possuem um papel indispensável em processos inflamatórios e cicatriciais (MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007).

A derme, por sua vez, é dividida em duas camadas. A primeira é a camada papilar, superficial e frouxa, caracterizada por fibras colágenas e elásticas mais finas e desorganizadas. Mais profundamente, encontra-se a camada reticular, mais densa e com fibras elásticas mais espessas e entrelaçadas com as fibras de colágeno, que se apresentam grossas e com boa organização (GARTNER; HIATT, 1999; SORRELL; CAPLAN, 2004).

Na derme, as principais células são os fibroblastos, responsáveis por sintetizar colágeno, elastina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, fibronectina e outras proteínas que compõem a matriz extracelular, sendo essas as responsáveis por conferir resistência e elasticidade para a pele (GARTNER; HIATT, 1999; MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007).

Além disso, entre os componentes celulares residentes na derme, encontram-se também linfócitos, células T de memória em sua maioria, macrófagos e monócitos, sendo essas células capazes de produzir sinais para o recrutamento de outras células inflamatórias, como os neutrófilos, sempre quando em frente a um estímulo nocivo (SPELLBERG, 2000).

Por ser imprescindível a integridade da pele para a manutenção de suas funções, em condições normais, ela possui um mecanismo de renovação celular constante, assegurando sua integridade estrutural. Assim, em homeostase, sua renovação acontece naturalmente. Ainda, o sistema imune de uma pele em condições normais, age de modo a protegê-la contra infecções e também, de possíveis descontroles em processos fisiológicos naturais, fazendo também a prevenção contra processos autoimunes. Além disso, a pele conta com uma grande capacidade de auto-regeneração ao sofrer algum ferimento (BENNETT et al., 2008).

Com isso, as células residentes da derme são especializadas em produzir substâncias desencadeadoras de uma resposta inflamatória, as quais são acionadas quando necessário, com a finalidade de restabelecer a fisiologia normal da pele frente a uma lesão tecidual (DEBENEDICTIS et al., 2001). Após ocorrer tal lesão, inicia-se uma sequência de eventos para o reparo tecidual, reestabelecendo assim, a estrutura e função protetora da pele, sendo

esse mecanismo denominado de processo cicatricial (FREINKEL; WOODLEY, 2001; CALIXTO et al., 2004).

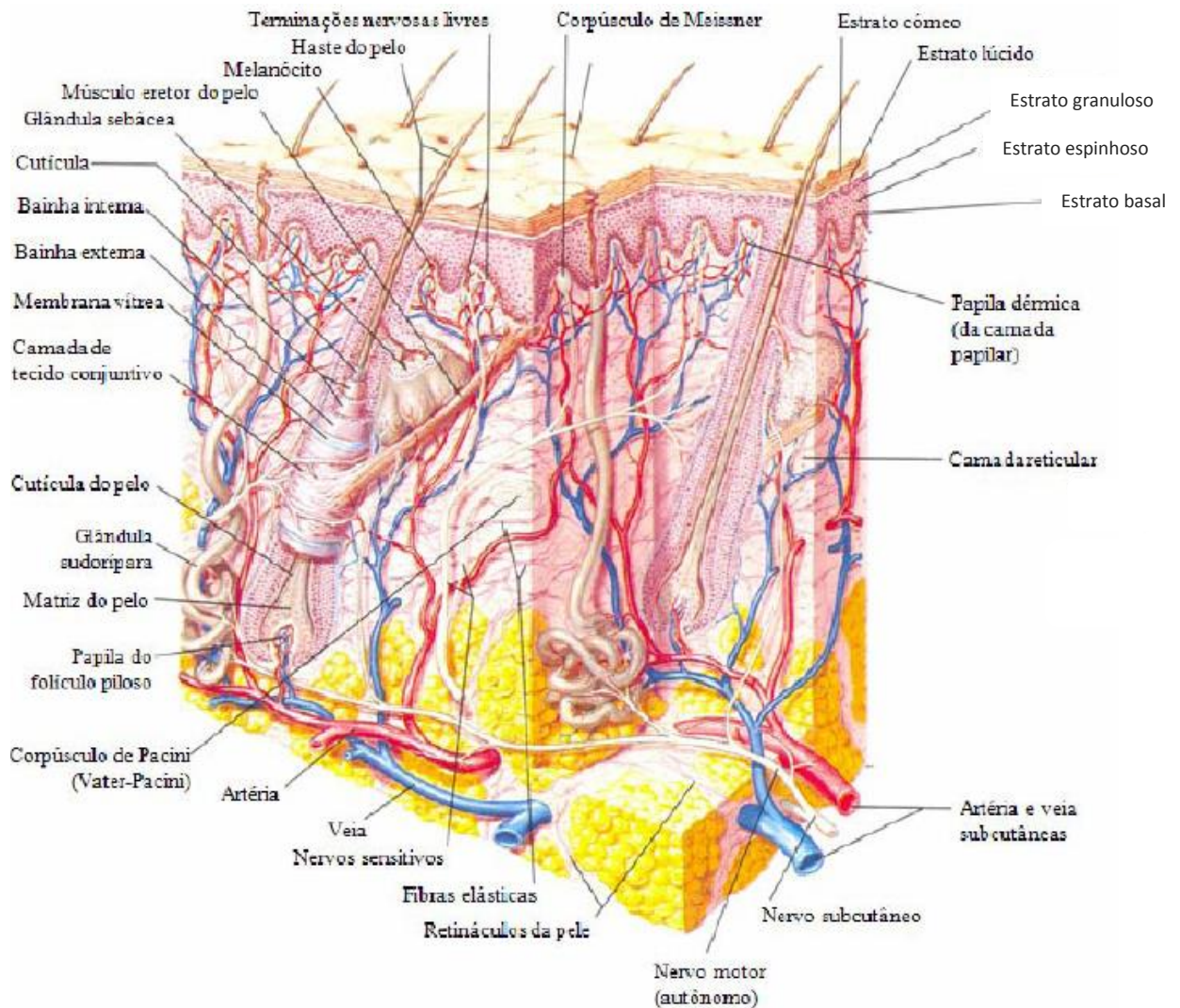


Figura 1- Esquema de corte histológico da pele.

Fonte: Adaptado de COCHARD et al., 2003.

1.2 Processo de cicatrização

O rompimento da continuidade normal da estrutura da pele caracteriza a lesão dérmica. Essa lesão pode ocorrer por agentes físicos, químicos ou biológicos, porém, todo organismo, conta com uma capacidade de auto-regeneração, atuando na cicatrização desse

ferimento, fator imprescindível para a sobrevivência. O processo de cicatrização é bastante complexo e dinâmico, envolvendo fenômenos bioquímicos, os quais podem ser prolongados ou impedidos por diversos fatores locais e sistêmicos. Entre os fatores locais encontram-se infecções, necrose, corpos estranhos e localização do ferimento. Fatores genéticos, idade, doenças como diabetes e uso de alguns medicamentos como corticoides caracterizam os fatores sistêmicos (RUSHTON, 2007; BORGES, 2008).

Considerando o processo cicatricial como um todo, é imprescindível ressaltar a participação das ROS, principalmente na sinalização celular. Além disso, as mesmas possuem um importante papel em condições inflamatórias. O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) tem sua produção aumentada, exercendo ação antimicrobiana, facilitando assim, a morte de microrganismos invasores. Entretanto, deve-se evitar o excesso dessas ROS, de forma que podem ocasionar estresse oxidativo durante o processo de reparo e com isso danos celulares (PARK; LIM, 2011).

O processo cicatricial envolve uma série de eventos que representam a tentativa de restabelecer a estrutura anatômica e a função normal do tecido lesionado (OLSSON et al., 2008). O processo de cicatrização ocorre em 3 fases distintas, complexas e sobrepostas, que são as fases de inflamação, proliferação e remodelação tecidual (CANDIDO, 2001) (Figura 2).

1.2.1 Fase inflamatória

A fase de inflamação é a primeira a ocorrer tendo duração média de três dias. Após o dano tecidual, as respostas hemostáticas provocam a formação do coágulo e ativação das plaquetas, formando uma matriz provisória para a migração celular e selando a ferida. As próprias plaquetas despertam a reação vasoconstritora, impedindo a perda de sangue (SCHÄFER; WERNER, 2008).

Assim, ocorre a coagulação do agregado plaquetário com fibrina que é depositada na ferida após a conversão do fibrinogênio. As plaquetas também liberam vários fatores quimiotáticos, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformante ($TGF-\beta$), que atraem leucócitos polimorfonucleares para a ferida, sinalizando o início da inflamação e realizando a defesa contra microrganismos (ARWERT; HOSTE; WATT, 2012; REINKE; SORG, 2012).

A resposta celular é iniciada logo após o ferimento, quando os leucócitos polimorfonucleares, entre eles os neutrófilos, começam a invadir a periferia da injúria. Muitos desses leucócitos sofrem lise liberando seus grânulos citoplasmáticos e assim, promovendo a degradação enzimática e preparação para a fagocitose feita por macrófagos. Após 24 horas do ferimento inicial, encontram-se presentes alguns monócitos, mas com 48 horas pós-ferimento, o número de macrófagos é muito mais considerável, tornando-se a principal célula inflamatória. Juntos, os neutrófilos e macrófagos fazem o desbridamento da ferida, liberam fatores de crescimento e iniciam a reorganização da matriz extracelular (ROSS; ODLAND, 1968; LUNDBERG; GERDIN, 1984; BRASKÉN, 1991; THORNTON; BARBUL, 1997).

Junto à fagocitose e a ativação de neutrófilos é conduzida a liberação de espécies reativas de oxigênio e proteases como potencial causa de lesão. Os neutrófilos contêm várias enzimas hidrolíticas e moléculas tóxicas em seus grânulos, podendo também gerar oxidantes como o $O_2^{\cdot-}$ e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além disso, a mieloperoxidase, enzima presente nos neutrófilos, pode gerar ácido hipoclorídrico, um agente de oxidação altamente reativo (TOUMI; BEST, 2006).

Essa cascata de eventos fisiológicos é essencial para o processo de cicatrização. Porém, se nessa fase esses eventos ocorrem de forma exacerbada, ocasionarão efeitos deletérios para o tecido. Dessa forma, um tempo menor e adequado de fase inflamatória implica em uma cicatrização eficaz e com tempo reduzido (DE MACEDO; SANTOS, 2006; TIAN et al., 2007).

1.2.2 Fase de proliferação

A segunda etapa do processo de cicatrização é o período proliferativo, que ocorre aproximadamente após três dias do ferimento inicial. Plaquetas e leucócitos juntos ativam fibroblastos, estimulam a síntese de colágeno, iniciam a angiogênese e dão suporte ao processo de reepitelização (proliferação de queratinócitos) via fatores de crescimento e citocinas (LUNDBERG; GERDIN, 1984; CAMPOS et al., 2007.).

A angiogênese, que é a produção de vasos sanguíneos no local da lesão, se faz indispensável para manter um aporte de nutrientes e oxigênio para as células metabolicamente ativas. Assim, a fase de proliferação culmina na formação do tecido de granulação, denso em

fibroblastos, granulócitos e macrófagos, altamente vascularizado e com feixes de colágeno tipo III fracamente ligados (RUBIN, 2002).

Nessa fase, com o início da síntese de colágeno e outras macromoléculas pelos fibroblastos, começa a ser gradualmente aumentada a força tênsil do ferimento, relacionada com o acúmulo desse colágeno (ROSS; ODLAND, 1968; LUNDBERG; GERDIN, 1984; BRASKÉN, 1991; CAMPOS et al., 2007). Posteriormente, os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, promovendo também a contração da ferida (RUBIN, 2002).

1.2.3 Fase de remodelação tecidual

A terceira fase da cicatrização é a de remodelamento. Com o decorrer do processo, a vascularização é reduzida, pois ocorre a diminuição capilar, muitos dos novos vasos são absorvidos, cessando também a formação destes (KITCHEN, 1998). Além disso, a deposição de colágeno é acentuada, evidenciando também o desaparecimento da maioria das células do tecido de granulação (apoptose de fibroblastos e células endoteliais), originando assim, a cicatriz. Essa fase é caracterizada pela retração na cicatriz e substituição do colágeno tipo III gerado na fase proliferativa pelo colágeno tipo I, mais resistente (SCHÄFER; WERNER, 2008; ARWERT; HOSTE; WATT, 2012; REINKE; SORG, 2012).

A resolução total de um ferimento é considerada após concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular, sendo que esse processo ocorre lentamente, podendo levar meses ou por vezes anos. Embora a taxa de síntese de colágeno desacelere após cerca de três semanas, a reticulação e reorganização do colágeno ocorrem por meses após a injúria na fase de remodelação do reparo e mesmo com isso, uma cicatriz madura possui apenas 70% da resistência de uma pele íntegra (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

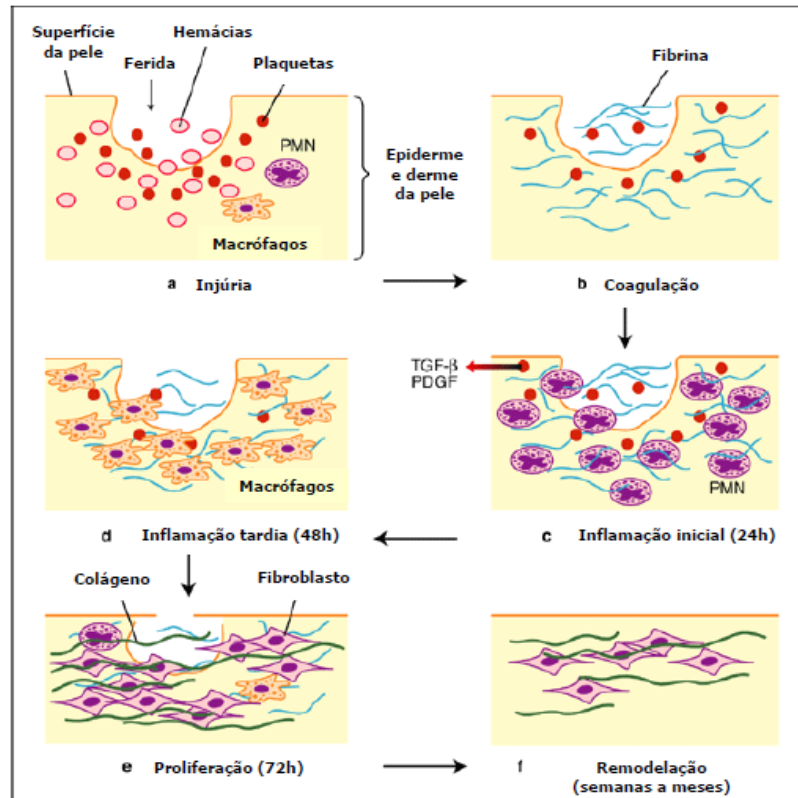


Figura 2- Representação esquemática das fases da cicatrização de feridas cutâneas.

Fonte: Adaptado de BEANES et al., 2003.

Nota: (a) Logo após a injúria, vasos sanguíneos danificados extravasam elementos sanguíneos e aminas vasoativas para dentro da derme. A permeabilidade vascular é temporariamente aumentada a fim de permitir que neutrófilos polimorfonucleares, plaquetas e proteínas plasmáticas infiltram a ferida. A seguir ocorre vasoconstrição em resposta aos fatores liberados por estas células.

(b) Ocorre a coagulação do agregado plaquetário com fibrina, a qual é depositada na ferida após a conversão do fibrinogênio.

(c) As plaquetas liberam vários fatores, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformante (TGF- β), que atraem neutrófilos para a ferida, sinalizando o início da inflamação.

(d) Após 48 horas, macrófagos substituem os neutrófilos tornando-se a principal célula inflamatória. Juntos, neutrófilos e macrófagos fazem o desbridamento da ferida, liberam fatores de crescimento e iniciam a reorganização da matriz extracelular.

(e) A fase de proliferação inicia por volta de 72 horas com os fibroblastos, os quais são recrutados para a ferida por fatores de crescimento liberados pelas células inflamatórias, iniciando a síntese de colágeno.

(f) A taxa de síntese de colágeno desacelera após cerca de três semanas, entretanto a reticulação e reorganização do colágeno ocorrem por meses após a injúria na fase de remodelação do reparo.

1.3 O balanço oxidativo

1.3.1 Espécies reativas de oxigênio

O oxigênio molecular (O_2) é relativamente não reativo e não tóxico, devido à estrutura estável dos elétrons na sua camada externa. Entretanto, alterações na distribuição dos seus elétrons podem provocar a sua ativação e influenciar os sistemas biológicos causando toxicidade. A partir de reduções parciais do oxigênio singlete (1O_2) ou de uma sucessiva adição de elétrons ao oxigênio molecular, formam-se intermediários reativos de oxigênio (Figura 3), tais como o $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , radical hidroxil (OH^{\cdot}). (PAVANATO; LLESUY, 2008).

Esses intermediários reativos são conhecidos como ROS, os quais são oriundos do metabolismo celular normal, principalmente mitocondrial, sendo encontrados em todos os sistemas biológicos. Essas moléculas são consideradas ativas, pois não necessitam da entrada de energia para reagir com outras moléculas (CHANCE et al., 1979).

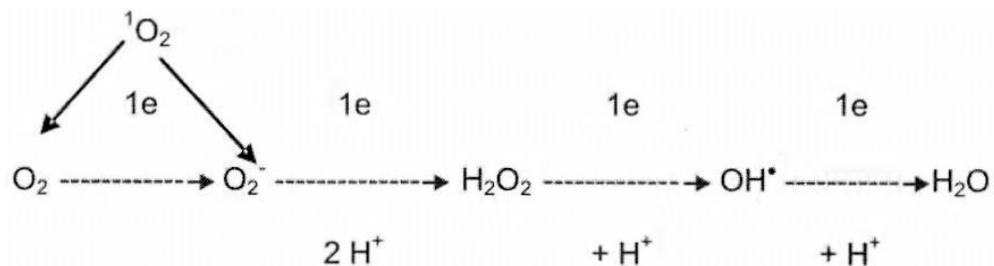


Figura 3- Formação das ROS a partir da redução parcial do oxigênio.

Fonte: PAVANATO; LLESUY (2008).

Algumas dessas espécies são radicais livres (RL) (CHANCE et al., 1979; PAVANATO; LLESUY, 2008). Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), RL é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que apresentem um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo. Os RL são formados pela perda ou ganho de um elétron de um não radical, por meio de reações redox ou de óxido-redução.

O 1O_2 é a forma excitada de O_2 e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. Seus alvos preferenciais em reações químicas são as duplas ligações como em ácidos graxos poli-insaturados ou guanina em bases de DNA (DIPLOCK et al., 1998).

O $O_2^{\cdot-}$ é formado a partir do O_2 mais a adição de um elétron. Essa formação ocorre continuamente, através de diversos processos celulares, incluindo os sistemas microsomal e mitocondrial de transporte de elétrons. Outras fontes também são a xantina desidrogenase/oxidase e outras oxidases celulares. As células mielóides contêm um complexo de transferência de elétrons associado à membrana plasmática, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, que reduz o oxigênio com a NADPH produzindo o $O_2^{\cdot-}$. Esse radical é considerado pouco reativo, pois não se difunde por distâncias consideráveis a partir do seu sítio de formação, porém, pode se combinar com outras espécies como o óxido nítrico, formando uma espécie mais reativa (FANG et al., 2002).

O H_2O_2 é gerado pelas mesmas fontes que produzem o $O_2^{\cdot-}$, pois tanto a destruição enzimática como a não enzimática deste produzem o H_2O_2 . Ele é uma espécie reativa não-radicalar citotóxica. As enzimas peroxissomais juntamente com o metabolismo de ácidos graxos e as enzimas citoplasmáticas responsáveis pela oxidação de metabólitos celulares, também são responsáveis pela sua formação. O H_2O_2 é considerado pouco reativo, pois não ataca diretamente os componentes celulares, entretanto, pode atravessar facilmente as membranas biológicas e se difundir por maiores distâncias (THOMAS, 2003). A partir desse radical pode também ser gerado o OH^{\cdot} através da reação do H_2O_2 com íons de ferro ou cobre (reação de Fenton) ou através da reação do H_2O_2 com o $O_2^{\cdot-}$ (reação de Haber-Weiss) catalisada por íons metálicos (FRIDOVICH, 1974; YU, 1994). Além disso, o H_2O_2 em baixas concentrações durante o processo de cicatrização atua como um sinalizador celular, estimulando a angiogênese (ROY et al., 2006).

O OH^{\cdot} é considerado a espécie mais reativa, devido ao fato de ser capaz de reagir com todas as biomoléculas, produzindo derivados que não podem ser regenerados pelo metabolismo celular. A vida média deste é muito curta, reagindo no seu próprio sítio de formação (DIPLOCK et al., 1998; THOMAS, 2003).

Em todas as fases do processo de cicatrização da pele, as ROS podem estar envolvidas (WLASCHEK; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, 2005). Em baixas concentrações as ROS e os seus subprodutos, tais como os metabólitos da oxidação de proteínas e lipídios, estão envolvidos nas vias de transdução de sinal intracelular e regulação de expressão gênica, podendo determinar a resposta anti-inflamatória, crescimento celular, diferenciação, proliferação e a resposta ao estresse (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; HALLIWELL, 2001; NAKASHIMA et al, 2003).

Dessa forma, as ROS são responsáveis por regular o processo de cicatrização (WLASCHEK; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, 2005; SCHÄFER; WERNER, 2008; SEN;

ROY, 2008). Além disso, essas espécies são indispensáveis na defesa contra microrganismos invasores (CLARK, 1996; D'AUTREAU; TOLEDANO, 2007).

Entretanto, segundo Sies (1991) altas concentrações de ROS devem ser evitadas pelo organismo, visto que a reatividade destes radicais traz consequências celulares deletérias. Podem provocar a oxidação de biomoléculas o rompimento da homeostase celular. Assim como, podem gerar retardos na cicatrização de ferimentos (SCHÄFER; WERNER, 2008).

1.3.2 Estresse oxidativo

Como visto, as ROS são produzidas em muitos processos fisiológicos e exercem funções importantes no organismo, como na participação da fagocitose, processos de sinalização celular, e estão envolvidas na síntese e regulação de algumas proteínas em condições fisiológicas. Entretanto, um aumento destas excedendo a capacidade de defesa antioxidante, vem a ocasionar danos celulares (BONDY; LE BEL, 1993).

Dessa forma, as ROS são necessárias para a homeostase do tecido, entretanto, ao ocorrer um aumento de sua produção durante uma lesão, se constitui em um fator propagador da resposta inflamatória sistêmica, levando a piora progressiva do estado metabólico (BARBOSA et al., 2007).

Quando ocorre um aumento abrupto das ROS que excede a capacidade de defesa do organismo, tem-se um quadro conhecido como estresse oxidativo (SIES, 1991). Isso se dá como resultado de um aumento na geração das ROS, através da acumulação de intermediários reativos, ou por um prejuízo do sistema de defesa antioxidante (inibição de enzimas antioxidantes, depleção de antioxidantes não enzimáticos), ou ainda por incapacidade para reparar o dano oxidativo. Este estado é desencadeado por uma série de condições, sejam elas ambientais ou patológicas (ALY et al., 2010).

O estresse oxidativo leva a vários prejuízos, entre eles a oxidação de biomoléculas como lipídeos e proteínas, podendo resultar em alterações na estrutura, permeabilidade e função secretora da membrana, gerando danos também ao DNA, mutações, perda funcional e morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Além disso, o estresse oxidativo está relacionado na patogênese de ferimentos de difícil cicatrização (SCHÄFER; WERNER, 2008). O dano originado pelo estresse oxidativo pode ser avaliado a partir da atividade das

enzimas antioxidantes e dos produtos da oxidação dos ácidos graxos insaturados. (GUTTERRIDGE; HALLIWELL, 1990; HALLIWELL; CHIRICO, 1993).

A oxidação dos lipídeos, ocorre através da interação entre ROS e lipídeos por reações em cadeia com três etapas: iniciação, propagação e terminação. A lipoperoxidação (LPO) a nível celular e de membrana, desencadeia reações que podem culminar na morte celular. Entre os produtos citotóxicos finais da LPO está o malondialdeído (MDA). Dessa forma, um aumento nos níveis de MDA indica danos oxidativos (GUTTERRIDGE; HALLIWELL, 1990; SCHAICH, 1992; COMPORTI, 1993; HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Assim, essas etapas podem ser verificadas através da medida dos hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (etapa de propagação) e das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (etapa de terminação) (HALLIWELL; GUTTERRIDGE, 2007).

Durante o estresse oxidativo, além da LPO, podem ocorrer também danos as proteínas que apresentam muitos sítios reativos que podem ser danificados. As ROS atuam sobre grupos amino das proteínas, alterando sua estrutura e função, formando grupos carbonil, os quais se correlacionam diretamente com danos causados às proteínas. Este processo é irreversível e causa, além de alterações conformacionais, a diminuição da atividade catalítica de enzimas e, finalmente, resulta em degradação de proteínas por proteases, devido a maior suscetibilidade. As ROS também podem induzir mitose e ocasionar perda da integridade do DNA (HALLIWELL, 1996).

1.3.3 Sistema de defesa antioxidante

A fim de atenuar as consequências da toxicidade causada pelo O_2 , os organismos aeróbicos desenvolveram o sistema de defesa antioxidante. Os antioxidantes são substâncias que, presentes em pequenas concentrações em comparação ao substrato passível de oxidar, retardam ou inibem a oxidação do mesmo (HALLIWELL; GUTTERRIDGE, 2007).

Os antioxidantes podem atuar removendo o O_2 presente no meio, impedindo a formação das ROS, quelando metais que catalisam a formação de ROS, induzindo a produção de antioxidantes endógenos e ainda, reparando os danos em biomoléculas danificadas como no DNA e na reconstituição de membranas celulares (BIANCHI; ANTUNES, 1999). O sistema de defesa antioxidante é composto por antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos,

que atuam conjuntamente na proteção celular mantendo a concentração das ROS dentro dos limites fisiológicos (NIJVELDT et al., 2001).

A proteção primária e intrínseca do organismo corresponde o mecanismo antioxidante enzimático, que evita o acúmulo do $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 , atenuando assim a formação das demais ROS. Esse sistema conta com enzimas como a SOD, CAT, glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR), GST, entre outras (RIBEIRO et al., 2005) (Figura 4).

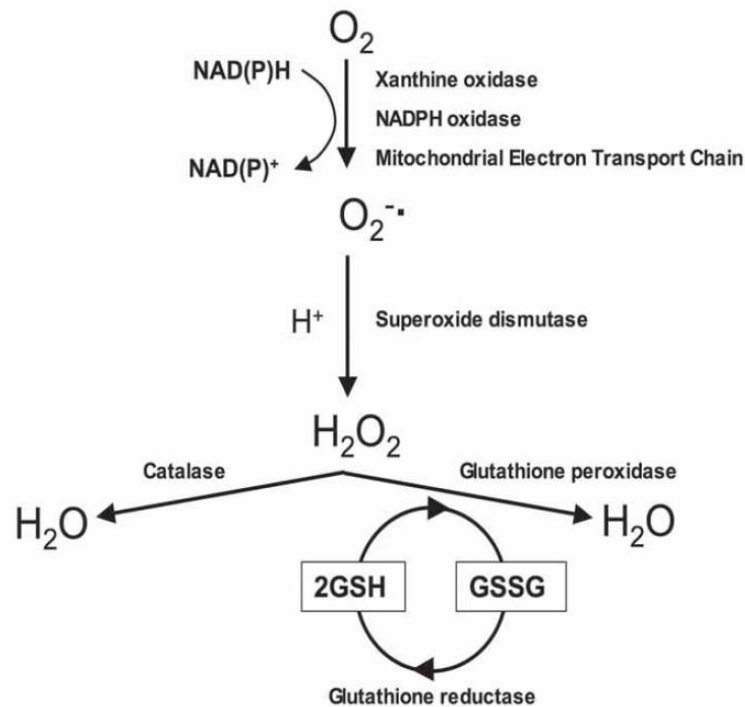


Figura 3- Remoção das ROS pelas enzimas antioxidantes.

Fonte: Adaptado de AITKEN; ROMAN, 2008.

A SOD, importante defesa antioxidante, está presente tanto no citosol (CuZn-SOD) quanto no interior da mitocôndria (Mn-SOD) e é responsável pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . O qual é convertido a O_2 e H_2O pela ação da enzima CAT. Dessa forma, os riscos para formação do OH^{\bullet} são diminuídos, fato de extrema importância, visto que o OH^{\bullet} é um dos mais potentes oxidantes em sistemas biológicos, uma vez que pode atravessar membranas celulares e reagir com biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA. A CAT é encontrada principalmente nos peroxissomos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A GPx, por sua vez, além de remover o H_2O_2 , também catalisa a conversão dos peróxidos inorgânicos e orgânicos (que são efetivos formadores de ROS, com a oxidação de

um doador de hidrogênio) a produtos menos reativos. Emprega a glutathiona reduzida (GSH) como substrato, formando a glutathiona oxidada (GSSG) e impedindo assim, a formação de OH^{\bullet} e o conseqüente dano celular. A GSSG, por sua vez, é reciclada a moléculas de GSH pela ação da enzima GR, utilizando a NADPH como doador de elétron (SIES, 1997). Por fim, a GST, constitui uma família de enzimas de detoxificação de fase II, que catalisa reações de conjugação entre GSH e moléculas oxidadas. Atua na remoção dos xenobióticos e produtos de LPO, transformando o composto tóxico em uma forma facilmente excretável (HABIG et al., 1974).

O sistema de defesa não enzimático corresponde a moléculas endógenas ou exógenas, sintéticas ou naturais que protegem o substrato de ser oxidado. Esse sistema atua suprimindo a geração de RL, por quelação de metais ou inibição de enzimas que os geram, além disso, atua também eliminando ou desativando os radicais (RIBEIRO et al., 2005).

Entre os antioxidantes exógenos estão o α -tocoferol, carotenoides, ácido ascórbico, flavonoides, entre diversos outros. O principal antioxidante não enzimático endógeno é a glutathiona. A GSH é um importante regulador da homeostase redox intracelular, atuando na eliminação de ROS e também, na manutenção de enzimas antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Esta é rapidamente oxidada em condições nas quais ocorre um aumento na produção de ROS. Assim, sua capacidade antioxidante é devida ao grupo sulfidril do aminoácido cisteína, o qual se oxida facilmente, atuando como um redutor celular (OHARA, 2006).

1.4 Campos magnéticos na cicatrização e no balanço oxidativo

O organismo é movido através de uma constante formação de energia biomagnética pelos fatores bioquímicos, fluidos celulares, atividade física, mental e a própria atividade celular. Os campos magnéticos promovem trocas com o potencial biomagnético do organismo, devido a isso, são benéficos em tratamentos de enfermidades. Ainda, os campos magnéticos auxiliam processos fisiológicos como o de reparação tissular, mediante controle do fluxo sanguíneo, controle humoral e propriedades anti-inflamatórias (ÁLVARES; GARCÍA; BLANCO, 2007).

Em relação as propriedades cicatrizantes do campo magnético, já foi evidenciado que que através da exposição a um campo magnético pulsado de 0,1 mT, por 30 minutos diários, é

possível auxiliar o processo de cicatrização em ratos. O estudo citado analisa os resultados no 21º dia e 60º dia, e demonstra a melhora da força de tração do tecido cicatricial, demonstrando que foi possível aumentar a resistência do tecido lesionado já em fases iniciais do pós-operatório, visto no 21º dia. Sendo este um fator de alta relevância clínica, devido a frequente necessidade da mobilização precoce de pacientes no leito de hospitais (STRAUCH et al., 2007).

O favorecimento ao reparo tecidual induzido por campos magnéticos pode ser fundamentado por estudos que demonstraram menores quantidades de citocinas inflamatórias a partir da exposição ao campo, demonstrando um efeito anti-inflamatório do mesmo (WERNER; GROSE 2003). Também foi demonstrado que a energia eletromagnética promove aumento do fluxo sanguíneo e a ativação de monofosfato de guanosina cíclico, resultando na liberação de fatores de crescimento, entre estes, o fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2), assim, estimulando a angiogênese. Em decorrência, esse conjunto de fatores, aceleram a cicatrização do tecido (CALLAGAN et al., 2008; CARRUTHERS; CARRUTHERS, 2012).

Demais estudos também comprovam a atuação de campos magnéticos na cicatrização. Foi demonstrado que a exposição de ratos em pós-cirúrgico, a um campo magnético de 160 mT, continuamente durante 15 dias, acelerou o fechamento da ferida além de ter uma atuação benéfica nos parâmetros histológicos, com maior infiltração de fibroblastos na fase proliferativa entre estes, melhorando assim a cicatrização (BERTOLINO et al., 2006). Ainda, outro estudo demonstra que com uma exposição de 30 minutos por dia, a um campo eletromagnético alternado de 30Hz e 800 mT, também foi capaz de melhorar o fechamento da ferida nos ratos expostos (MATIC et al., 2009).

Pesquisas também investigaram os efeitos da exposição de queratinócitos humanos (HaCaT) a um campo magnético sinusoidal de 2 mT (50 Hz) por 96h. Foi constatado que exposição de tecidos lesados a essas condições de campo, geram um aumento na proliferação celular, e também a modificações estruturais de queratinócitos, células do tecido epitelial, assim, beneficiando a regeneração da epiderme (MANNI et al., 2002).

Segundo Yamaguchi et al. (2006) a exposição a esses campos tem sua importância no que diz respeito a pele, não só a cicatrização, mas também, no tratamento de melanoma, demonstrando a partir de estudo com camundongos que uma exposição a campo magnético de 250 mT levou a uma redução de 54% no tamanho do tumor.

Quanto a atuação dos campos magnéticos no perfil oxidativo, a literatura é bem controversa. Diversos estudos demonstraram que exposição a campos magnéticos geram estresse oxidativo (SHALABY; SHAWKI, 2006; HASHISH et al., 2008; EMRE et al., 2011).

Entretanto, foi evidenciado que a exposição de ratos a um campo eletromagnético pulsado de 2 mT não ocasionou danos oxidativos. Esses animais foram expostos ao campo eletromagnético 8h por dia, durante 90 dias. Análises sanguíneas foram realizadas nos tempos de 45, 60 e 90 dias. Os biomarcadores oxidativos (TBARS, SOD, GPx, CAT e glicose-6-fosfato desidrogenase) não demonstraram diferença entre os grupos, permanecendo com os parâmetros normais e sem danos (ERASLAN et al., 2007).

É visto que a exposição a campos magnéticos de baixa frequência atua sobre o metabolismo celular, e pode estar relacionada a ativação e inibição de determinadas enzimas. A exposição ao campo magnético de 10 mT e frequência de 40 Hz, por 14 dias, 30 minutos por dia, durante o processo de cicatrização, diminuiu os níveis de TBARS e aumentou a atividade da GPx no fígado de ratos após 14 dias de tratamento. Este estudo também revelou um aumento da atividade da GST no dia 6, demonstrando que o campo magnético promoveu ativação do sistema antioxidante enzimático e redução da LPO (GLINKA et al., 2013).

Em concordância, um estudo semelhante demonstrou que campo magnético de baixa frequência de 50 HZ e diferentes intensidades (1, 2 e 3 mT 4-8h) levou a um aumento nos níveis de GSH no coração e uma diminuição na atividade da mieloperoxidase. Entretanto, na pesquisa anteriormente citada, é demonstrado, que diferentes intensidades de campo, e o tempo de exposição, podem modificar o balanço redox também de forma negativa. Os níveis de MDA, assim como, as ações enzimáticas, apresentaram-se elevados ou diminuídos, dependendo dos fatores de exposição (CANSEVEM; COSKUN; SEYHAN, 2008).

Dessa forma, o tempo de exposição ao campo magnético é determinante na atuação da homeostase redox. A exposição a um campo magnético de 40 Hz, 7 mT, 30 min por dia, durante 14 dias, demonstrou não afetar o balanço oxidativo. Os níveis de TBARS, GSH, H₂O₂, o total de grupos sulfidrila livres no coração, e também, a capacidade antioxidante total do plasma, se mostraram inalterados em relação ao controle. Porém, a exposição ao mesmo campo durante 60min, provocou um aumento significativo nos níveis de TBARS e na concentração de H₂O₂, assim como, diminuiu a concentração de GSH, nos grupos sulfidrila livres e na capacidade antioxidante no plasma, culminando no estresse oxidativo (GORAKA; CIEJKA; PIECHOTA, 2010).

Visto que em todas as fases do processo de cicatrização as ROS estão envolvidas (WLASCHEK; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, 2005), e também que, quando em quadro de estresse oxidativo, estas estão relacionadas à patogênese de ferimentos de difícil cicatrização (SCHÄFER; WERNER, 2008), além de diversos outros prejuízos a macromoléculas (SIES, 1991), é imprescindível a determinação de um tratamento eficiente

com campos magnéticos, que seja capaz de auxiliar na cicatrização da pele e em conjunto não ocasionar danos oxidativos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do campo magnético pulsado de 23 mT e frequência de 62Hz na cicatrização de pele e no balanço oxidativo em ratos *Wistar*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros histológicos perante a cicatrização de pele (regeneração dérmica, regeneração epidérmica, infiltração de fibroblastos, infiltrado inflamatório e angiogênese).
- Avaliar o índice de fechamento da ferida;
- Avaliar a resistência à tração do tecido cicatrizado;
- Avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase na pele;
- Determinar os níveis de LPO através da medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na pele e no fígado;
- Analisar as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST na pele e no fígado;
- Avaliar o conteúdo dos grupos tióis não proteicos (medida indireta de GSH) na pele e no fígado.

3 MANUSCRITO

O manuscrito está disposto conforme as especificações requisitadas pela revista PLASTIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY, ao qual foi submetido para publicação.

Pulsed Magnetic Fields Accelerate Cutaneous Wound Healing And Do Not Cause Oxidative Damage In Rats

Jéssica F. Dalenogare, M.S.^a

Giovana M. Ourique, M.S.^a

Marina S. Vencato, B.S.^b

Tanise S. Pês, M.S.^a

Etiane M. H. Saccol, M.S.^a

Rafael P. Cipolatto, B.S.^a

Camila C. Pozza, B.S.^c

Susana F. Llesuy, Ph.D.^d

Sara Marchesan, Ph.D.^c

Marcos Carara, Ph.D.^e

Cristina C. Krewer, Ph.D.^b

Marcelo L. Da Veiga, Ph.D.^b

Maria Izabel U. M. Rocha, Ph.D.^b

Maria Amália Pavanato, Ph.D.^{a*}

^aDepartment of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97105-900, Brazil

^bDepartment of Morphology Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97105-900, Brazil

^cDepartment of Biochemistry Faculty of Pharmacy and Biochemistry Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97105-900, Brazil

^dDepartament of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires 1113, Argentina

^eDepartment of Physical Biochemistry Faculty of Pharmacy and Biochemistry Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97105-900, Brazil

**Corresponding author: Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, 1000, Avenue Roraima, Camobi 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel./fax: + 55 55 3220 9381.*

E-mail address: amaliapavanato@yahoo.com.br (M.A. Pavanato).

ABSTRACT

Background: The surgical postoperative period requires rapid, effective and good-quality wound repair. An alternative to aid wound repair, as well as to improve the appearance of the scarred region, is the use of pulsed magnetic fields. During the treatment for healing, the pulsed magnetic fields can alter the redox homeostasis of the tissue, and these effects depend on the intensity, frequency, and duration of exposure. This study aimed to assess the effectiveness of pulsed magnetic fields in specific configurations on skin healing in male Wistar rats, as well as their effect on the oxidative profile.

Methods: Tissue-removal surgery (1 cm²) was performed on the back of all animals, which were separated into two groups: control (no exposure) and the group treated with exposure to the pulsed magnetic field (23 mT, 62 Hz), 30 minutes per day for 14 days. After 3, 7, and 14 experimental days, several analyses were performed: histology, wound contraction, tensile testing, myeloperoxidase activity in the skin, and biomarkers of oxidative stress in the skin and liver.

Results: The treatment with the pulsed magnetic field has increased the rate of wound contraction, epidermal and dermal regeneration and the tensile strength of the scar. It was also observed reduction in the inflammatory infiltration, as well as myeloperoxidase activity. In addition, the pulsed magnetic field did not promote oxidative stress under these conditions.

Conclusions: The proposed treatment helps the healing of the skin, improves the condition of the scar tissue and does not promote oxidative damage.

Keywords: Pulsed magnetic field; wound healing; skin; antioxidants; oxidative stress.

INTRODUCTION

The healing of skin and the quality of the scar tissue is necessary for effective postoperative process. Healing involves three phases: clot formation and inflammation, proliferation and tissue remodeling¹. In all these stages, reactive oxygen species (ROS) may be involved².

Pulsed magnetic fields have been proposed to aid in the healing process and to improve the final appearance of the scar tissue. This is promoted by control of blood flow, humoral control and anti-inflammatory properties³.

The effects produced by magnetic fields are dependent on the intensity, frequency, and duration of exposure. These parameters are also critical for changes in the oxidative balance, which can be produced by the field. According to these parameters, the magnetic fields can cause oxidative stress or not⁴. When oxidative stress is triggered, it is related to pathogenesis of poorly healing wounds⁵, so it is essential to determine which magnetic fields are capable of aiding the healing of skin without causing oxidative damage to tissue.

The present study aimed to evaluate the healing potential of a pulsed magnetic field (23 mT, 62 Hz) and its effects on redox balance.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats, aged 90 days, were obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Santa Maria, and were kept in the vivarium of the Department of Physiology in climatic and ventilated shelves, with a controlled temperature ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) and a 12-hour light/dark cycle. The diet was supplied *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria, registration n° 119/2013.

Pulsed Magnetic field

The pulsed magnetic field was generated by an electromagnet powered by a source of pulsating voltage and was controlled by a microprocessor, generating electrical pulses at

constant intervals of 1.5 s and a rectified sine wave. The wave frequency was 62 Hz and the pulsed magnetic field value was 23 mT. Figure 1 shows a schematic diagram of the system.

The relationship between the voltage on the electromagnet coils and the pulsed magnetic field strength was calibrated by a probe Hall (Globalmag/TMAG-01T) and a digital multimeter (Eico/18d7).

The homogeneity of the pulsed magnetic field in the region between the poles of the electromagnet was verified by measurements with the Hall probe, and it is represented in Figure 2. Inside the region limited by the yellow line, it is clear that in a volume of 12 (poles separation) $\times 7.5 \times 10.0 \text{ cm}^3$ the magnetic field homogeneity is better than 10%.

In order to exposure to the pulsed magnetic field, the animals were restrained for a period of 30 min in containment tubes (PVC, 5cm diameter) with perforated covers for ventilation. During the exposure, the voltage in the electromagnet coils was continuously monitored using a digital multimeter (Eico/18d7).

Experimental design

The pulsed magnetic field was determined by the literature^{6,7,8,9}, and used a field density of 23 mT and a frequency of 62 Hz, with a 30 min exposure daily for 14 days.

At the beginning of the experimental phase, each animal was anesthetized with ketamine hydrochloride (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) intraperitoneally¹⁰, and immobilized on a surgical table. The surgery consisted of a circular wound (1 cm²) on the middle of the back of each animal, which was made using forceps and scissors¹¹.

After surgery the animals were divided into two groups (n = 24): Group 1: control – animals without treatment during the postoperative period; Group 2: treated with pulsed magnetic field (PMF) – animals postoperatively treated with a pulsed magnetic field (23 mT, 62 Hz). On days 3, 7, and 14 after surgery, eight animals of each experimental group were anesthetized as described above and euthanized by exsanguination for collecting of samples and conducting the analyses.

Histological analysis

After euthanasia, the skin samples were removed, fixed in 10% buffered formalin, and embedded in histological paraffin for light microscopic examination. Sections (6- μm thick) were stained using the Masson–Goldner trichrome method¹². Blinded histological scoring was

performed by two trained histologists according to the presence of the following parameters: epidermal regeneration (0, thickness of cut edges; 1, migration of keratinocytes; 2, bridging of the incision; 3, keratinization); dermal regeneration, inflammatory infiltration, infiltration of fibroblasts, angiogenesis (0, absent; 1, rare; 2, mild; 3, moderate; 4, marked; 5, very marked)^{13,14,15}.

Wound contraction

Photographic records were performed to measure the rate of wound contraction, obtained from the percentage of wound regression. These records were performed shortly after the surgical procedure and at the time of euthanasia (3, 7 and 14 days). Macroscopic analysis was performed by software ImageJ version 1.

Tensile strength of skin

The skin samples were placed in position on the universal machine test (AME-5KN) to measure the tensile strength, which was controlled by Dynaview Standard/F Pro software. The test speed was 4 mm/min until a complete break occurred in the skin. The data were expressed as kilogram-force (kgf).

Leukocyte infiltration marker (myeloperoxidase)

To estimate the inflammatory cell infiltration in the skin after injury, skin samples were collected to evaluate the activities of myeloperoxidase (MPO) enzyme, which is a marker of neutrophils^{16,17}.

Biomarkers of oxidative stress

The oxidative stress biomarkers were analyzed in the skin and liver. The protein content was measured¹⁸. The lipoperoxidation (LPO) levels were estimated using the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) technique¹⁹.

Total superoxide dismutase (SOD) activity was based on the inhibition rate of autocatalytic adenochrome generation at 480 nm²⁰. Catalase (CAT) activity was evaluated by

following the decrease in the 240-nm absorption of hydrogen peroxide²¹. Glutathione S-transferase (GST) activity was measured by the rate of dinitrophenyl-S-glutathione formation at 340 nm²².

Non-protein thiols (NPSH) content, an indirect measure of glutathione (GSH) were evaluated at 412 nm after reacting with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). Proteins were eliminated through the addition of 0.5 M perchloric acid²³.

Statistical analysis

For quantitative analysis, the homogeneity of variances between the different concentrations tested was verified by the Levene test, followed by two-way ANOVA and the Tukey test. For the skin tensile test, after the Levene test, one-way ANOVA was used followed by the Tukey test. For qualitative analysis, a non-parametric Scheirer–Ray–Hare extension of the Kruskal–Wallis test was used, followed by the Nemenyi test. The analyses were performed using Statistica software (version 7.0) and differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Histological analysis

The photomicrograph of the skin in their respective groups and specific times was represented in the Figure 3. The infiltration of fibroblasts increased in the PMF group on day 7 and decreased at day 14 compared to the control. Moreover, in both groups, there was an increase on day 7 compared to the 3rd and 14th days (Table 1).

The group treated with pulsed magnetic field has shown greater epithelial regeneration on 3rd and 7th days compared to the control group. Over time the expected development of epithelial regeneration was observed: epithelial regeneration was higher on 14th day than on 3rd and 7th days, similarly this parameter was higher on the 7th day than that on the 3rd day (Table 1).

The dermal regeneration in the 7th day was increased in the PMF group compared to the control group. Over time, both groups on the 14th day has shown an increased dermal regeneration compared to the 3rd and 7th days, as well as the 7th day increased dermal regeneration compared to the 3rd day (Table 1).

The inflammatory infiltrate decreased on the 3rd day in the PMF group compared to the control. Changes were also noticed over time in both, PMF and control groups, with gradual decrease in inflammation from the 3rd to the 14th day. In the PMF group the inflammatory infiltrate was rise on the 3rd day than on the 7th day. In the control group the inflammatory infiltrate decreased on the 3rd day than on the 7th day (Table 1).

The angiogenesis in the PMF group increased on the 7th day compared to the control group. There were also changes over time in both groups, with the 7th day values being greater than those of the 3rd and 14th days. In the same way, there was an increase in this parameter in the 3rd day compared to the 14th day (Table 1).

Wound contraction

An increase in the wound contraction of the PMF group compared to the control group was observed on the 7th day (Figure 4). Furthermore, the progression of the wound contraction over time in all groups is shown. As physiologically expected, the control and treated groups at day 3rd showed lower wound contraction than in the 7th and 14th day, and on day 7th were lower than the 14th day after the injury. On day 14th all animals were with the healing process completed.

Tensile strength of skin

The tensile strength of the skin was examined on the 14th day when healing was already effective in all groups. The PMF group has demonstrated an increasing in tensile strength of the healed skin compared with the control group (Figure 5).

Leukocyte infiltration marker (myeloperoxidase)

In the initial phase of the healing process (3rd day), the PMF group showed a reduction in myeloperoxidase activity compared with the control group (Figure 6). Moreover, a reduction in myeloperoxidase activity over time was observed. The myeloperoxidase activity was higher in the control group on day 3 compared to the days 7 and 14, and on the 7th day, the activity of this enzyme was higher than the control group on the 14th day. PMF group on day 14 showed a reduction in myeloperoxidase activity compared to the 7th day.

Biomarkers of oxidative stress on the skin

The PMF group on the 7th day showed a reduction in the levels of TBARS compared with the control group on the 7th day. The SOD activity of the control group on the 14th day was reduced compared with the control group on the 7th day, this reduction was not observed in the PMF group (Table 2).

Biomarkers of oxidative stress in the liver

The protein content did not differ between experimental groups. The SOD activity demonstrated a variation over time. Both the control and the PMF group had a higher activity of SOD on day 7 compared to day 3 in their respective groups. The NPSH content of the PMF group on days 7 and 14 was higher than that on the 3rd day from the same group (Table 3).

DISCUSSION

The human body is moved through constant generation of biomagnetic energy, either by biochemical factors, cellular fluids, physical, mental, and cellular activity. As a result, the application of magnetic fields to treat diseases is understandable since this causes biomagnetic exchanges in the human body, and may act on wound healing by control of blood flow, humoral control and anti-inflammatory properties³.

The beneficial role of magnetic fields has been reported previously using histological parameters, with greater infiltration of fibroblasts in the proliferative phase, thus improving the healing¹¹. In the present study, we showed that treatment with the PMF for 7 days increased infiltration of fibroblasts, which benefited the healing process. With the development of this wound repair, collagen deposition increases and the cells go into apoptosis process, including fibroblasts²⁴. In addition, is noted a decrease of fibroblasts on the 14th day, which was higher in the group treated with the pulsed magnetic field than in the control, leading to more advanced maturation of the scar.

The healing of the skin takes place most effectively when there is a natural reconstruction of the epidermis and dermis leading to contraction of the wound⁵. In this study, it was shown that exposure to PMF led to an improvement in the epidermal and dermal

regeneration, accelerated wound contraction and increased the tensile strength of the skin already healed, demonstrating the effectiveness of the healing process.

The improvement in tissue repair induced by exposure to magnetic fields can be substantiated by studies that have shown lower amounts of inflammatory cytokines²⁵. The treatment with the pulsed magnetic field in this study triggered an improvement in the inflammatory profile by a reduction in the myeloperoxidase activity, indicating less neutrophil infiltration at day 3 of treatment. This parameter was confirmed by the histological analysis, that showed lower infiltration of inflammatory cells during this period, which corresponds to the inflammatory phase of the healing process²⁶.

Studies have demonstrated that electromagnetic energy increases blood flow and exerts anti-inflammatory effects. In the course of these events, there is cyclic guanosine monophosphate activation, resulting in the release of growth factors, such as fibroblast growth factor 2 (FGF-2)²⁷ an stimulator of angiogenesis²⁸.

The results this present study with PMF showed a rise in angiogenesis on the 7th day. Angiogenesis consists in the production of blood vessels at the site of the lesion and is an indispensable method for maintaining a supply of nutrients and oxygen to the metabolically active cells. The formation of new blood vessels is marked in the healing process, with an increase 2–3 days after injury²⁹. The increase in new vessels observed with the use of PMF reflects on the improvement of other parameters, such as wound contraction and epidermal and dermal regeneration.

A previous study, using a magnetic field of 160 mT with continuous exposure, has shown accelerated wound contraction in mice in the postoperative period for 15 days¹¹. In this present study, animals exposed to a pulsed magnetic field also shown an increase in the wound contraction. Moreover, it was reported that during exposure to a pulsed magnetic field of 0.1 mT daily for 30 minutes at 21 and 60 days with an improved resistance to traction of scar tissue on day 21, demonstrating that it was possible to increase the tensile strength of skin already in the initial postoperative phases³⁰. Furthermore, the increase in the tensile strength indicates better wound healing³¹. This study demonstrated an increase of skin tensile strength, featuring a better condition of the scared tissue from the pulsed magnetic field.

Different magnetic fields can alter the existing balance between ROS and antioxidants⁴. In the present study, it was observed that exposure to the pulsed magnetic field on the 7th day reduced the TBARS levels in the skin compared with the control group.

Moreover, exposure to the pulsed magnetic field did not alter the liver TBARS levels, or the activity of CAT enzyme and GST in the skin and liver.

The activity of SOD in the skin showed a reduction at day 14 compared to day 7 in the control group, however, treatment with pulsed magnetic field inhibited this reduction. This may have been due to the SOD being consumed to restore the healing process in the control group. Regarding the activity of SOD in the liver, this showed changes over time for the PMF group, which was also observed in the control group, with no differences between these groups. Thus, the pulsed magnetic field assisted in maintaining the SOD activity, as well as the other antioxidant enzymes.

In agreement with this study, it has been shown that exposure to a pulsed electromagnetic field of 2 mT (8 h per day for 45, 60, and 90 days) did not trigger changes in TBARS, SOD, CAT, glutathione peroxidase, or glucose-6-phosphate dehydrogenase³². However, other studies have shown that magnetic fields generate oxidative stress^{7,8,9} and show great disagreement about the performance of magnetic fields in redox homeostasis.

In another study with wound healing in mice, a low-frequency magnetic field acted on cell metabolism and was related to the activation and inhibition of certain enzymes. Exposure to a magnetic field of 10 mT and frequency of 40 Hz for 30 min a day for 14 days decreased the liver TBARS levels and increased the activity of GPx on day 14 and GST on day 6, indicating that the magnetic field promoted activation of the enzymatic antioxidant system and reduced LPO³³. These results are similar to those found in this study, since the proposed therapy also reduced the TBARS levels on the 7th day in the skin.

As for the liver content of NPSH, there was an increase on the 7th and 14th day of the group treated with the pulsed magnetic field compared to the 3rd day. Similarly, it has been shown that a low-frequency magnetic field of 50 Hz and different intensities (1, 2, and 3 mT 4–8h) in guinea pigs led to an increase in GSH levels in the heart, as well as a reduction in the levels of MPO⁴. The present study also reported a reduction in the MPO activity. Still, the referenced study shows that different magnetic field intensities and exposure times may modify the redox balance negatively. MDA levels, as well as enzyme activity, may be increased or decreased depending on the exposure factors.

Thus, the exposure time to the magnetic field is crucial in the performance of redox homeostasis. Exposure to a magnetic field of 40 Hz and 7 mT for 30 min per day during 14 days has affected the oxidative balance. However, exposure of 60 min (durante qual periodo?) has promoted stress⁹. The present study also shown that exposure for 30 min (durante qual periodo?) did not cause oxidative damage.

CONCLUSION

This study has demonstrated that a pulsed magnetic field of 23 mT and 62 Hz for 30 min was effective in wound healing, has reduced the infiltration of inflammatory cells in the early stages, helped the remodeling and increased tensile strength of the healed skin. Furthermore, this study has shown that pulsed magnetic field with specific configurations of intensity, frequency and duration maintains the redox homeostasis and does not cause oxidative stress.

References

1. Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res.* 2012; 49:35-43.
2. Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Rep Reg.* 2005; 13:452–461.
3. Pérez Govea A. La naturaleza, el hombre y el magnetism. *Rev cubana med integr.* 2002; 18:73-75.
4. Cansevan AG, Coskun S, Seyhan N. Effects of various extremely low frequency magnetic fields on the free radical processes natural antioxidante system and respiratory burst system activities in the heart and liver tissues. *Indian J Biochem Biophys.* 2008; 45:326-331.
5. Schäfer M, Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol Res.* 2008; 58:165–171.
6. Shalaby T, Shawki M. Biophysical and biochemical changes in the characteristics of rat blood exposed to combined alternating and static magnetic fields (in vivo study). *Romanian J. Biophys.* 2006; 16:169-180.
7. Hashish AH, Missiry MA, Abdelkader HI, et al. Assessment of biological changes of continuous whole body exposure to static magnetic field and extremely low frequency electromagnetic fields in mice. *Ecotoxicol Environ Safety.* 2008; 71: 895–902.
8. Emre M, Cetiner S, Zencir S, et al. Oxidative Stress and Apoptosis in Relation to Exposure to Magnetic Field. *Cell Biochem Biophys.* 2011; 59:71-77.
9. Goraca A, Ciejka E, Piechota A. Effects of extremely low frequency magnetic field on the parameters of oxidative stress in heart. *J Physiol Pharmacol.* 2010; 61:333-338.

10. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras.* 2010; 56:103-111.
11. Bertolino G, Braga AF, Rosa KO, et al. Macroscopic and histological effects of magnetic field exposition in the process of tissue reparation in Wistar rats. *Arch Dermatol Res.* 2006; 298:121–126.
12. Goldner JA. Modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol.* 1928; 14:237-243.
13. Gál P, Toporcern T, Grendel T, et al. Effect of Atropa belladonna L. on skin wound healing: Biomechanical and histological study in rats and in vitro study in keratinocytes, 3T3 fibroblasts, and human umbilical vein endothelial cells. *Wound Rep Reg.* 2009; 17:378–386.
14. Marini H, Polito F, Altavilla D, et al. Genistein aglycone improves skin repair in an incisional model of wound healing: a comparison with raloxifene and oestradiol in ovariectomized rats. *Br J Pharmacol.* 2010;160: 1185–1194.
15. Melo CM, Porto CS, Melo MRJ, et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *Int J Pharm.* 2011; 408: 113–119.
16. Silva CR, Oliveira SM, Rossato MF, et al. The involvement of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice. *Life Sci.* 2011; 88:1077-1087.
17. Oliveira SM, Silva CR, Wentz AP, et al. Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole. A Celecoxib structural analog in models of pathological pain. *Pharmacol Biochem Behav* 2014; 124:396-404.
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farra L, et al. Protein measurement with the Folin Phenol. *Reagent J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.
19. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52:302-310.
20. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247:3170-3175.
21. Boveris A, Chance B, Mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973; 134:707-716.
22. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974; 249:7130-7139.
23. Ellman J. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 82:70-77.

24. Clark RAF. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations I. *Journal of the American Academy of dermatology*, v. 13, p. 701-725, 1985.
25. Werner S, Grose R. Regulation of healing by growth factors and cytokines. *Physiol Ver.* 2003; 83:835–70.
26. Ross R, Odland G. Human wound repair: II Inflammatory cells, epithelial-mesenchymal interrelations, and fibrogenesis. *J Cell Biol.* 1968; 39:152-168.
27. Carruthers J, Carruthers A. Electromagnetic Radiation and Wound Healing. *Dermatol Surg.* 2012; 38:451–453.
28. Callaghan M, Chang E, Seiser N, et al. Pulsed Electromagnetic Fields Accelerate Normal and Diabetic Wound Healing by Increasing Endogenous FGF-2 Release. *Plast Reconstr Surg.* 2008; 121:130-141.
29. Rubin E, Farber L. *Patologia*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
30. Strauch B, Patel M, Navarro J, et al. Pulsed Magnetic Fields Accelerate Cutaneous Wound Healing in Rats. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 120: 425-430.
31. Werner S, Breeden M, Hubner G, et al. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and Delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Invest Dermatol.* 1994; 103:469–473.
32. Eraslan G, Bilgili A, Akdogan M, et al. Studies on antioxidant enzymes in mice exposed to pulsed electromagnetic fields. *Ecotoxicol environ saf.* 2007; 66:287-289.
33. Glinka M, Sieron A, Birkner E, et al. Influence of extremely low-frequency magnetic field on the activity of antioxidant enzymes during skin wound healing in rats. *Eletromagn Biol Med.* 2013; 32:463-470.

Figure captions

Figure 1- Schematic diagram of the pulsed magnetic field application system, composed by the electromagnet (pair of solenoids wound on a silicon-iron core) and the source of pulsed voltage. Region “A” indicates where the animals were confined under the action of the pulsed magnetic field.

Figure 2- Magnetic field intensity map between the poles of the electromagnet. Inside the region limited by the yellow line, the variation of the magnetic field intensity was not greater than 10%. This was the region where the animals were exposed to the magnetic field.

Figure 3- Photomicrograph of damaged skin.

The arrow indicates the presence of epithelium, "C" corresponds to crust, "f" fibrin and "d" dermis (Goldner X40).

Figure 4- Wound contraction.

Values are represented as the man \pm SEM. * Indicates significant differences from the control group at the same time ($P < 0.05$). Different lowercase letters indicate significant differences between times at the same treatment ($P < 0.05$).

Figure 5- Tensile strength of skin.

Values are represented as the man \pm SEM. * Indicates significant differences from the control group ($P < 0.05$).

Figure 6- Myeloperoxidase activity.

Values are represented as the man \pm SEM. * Indicates significant differences from the control group at the same time ($P < 0.05$). Different lowercase letters indicate significant differences between times at the same treatment ($P < 0.05$).

Table 1- Histological parameters in the skin.

Time	Treatments	Infiltration of fibroblast	Epidermal regeneration	Dermal regeneration	Inflammatory infiltration	Angiogenesis
3 rd day	Control	2.50 ± 0.38 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.63 ± 0.18 ^a	4.38 ± 0.18 ^a	2.63 ± 0.65 ^a
	Pulsed magnetic field	2.25 ± 0.25 ^a	0.63 ± 0.26 ^{*a}	0.75 ± 0.16 ^a	3.63 ± 0.18 ^{*a}	2.75 ± 0.59 ^a
7 th day	Control	3.57 ± 0.20 ^b	0.86 ± 0.26 ^b	1.29 ± 0.18 ^b	4.00 ± 0.38 ^b	3.43 ± 0.37 ^b
	Pulsed magnetic field	4.13 ± 0.23 ^{*b}	1.75 ± 0.25 ^{*b}	2.38 ± 0.18 ^{*b}	4.25 ± 0.16 ^b	4.25 ± 0.25 ^{*b}
14 th day	Control	2.57 ± 0.20 ^a	2.86 ± 0.14 ^c	4.00 ± 0.00 ^c	1.57 ± 0.43 ^c	1.57 ± 0.37 ^c
	Pulsed magnetic field	1.86 ± 0.34 ^{*a}	2.86 ± 0.14 ^c	4.57 ± 0.20 ^c	1.14 ± 0.14 ^c	1.57 ± 0.43 ^c

Values are represented as the man ± SEM. * Represents differences from the control at the same time. Lowercase letters represent differences in the same group at different times. (P < 0.05).

Table 2- Biomarkers of oxidative stress in the skin.

Time	Treatments	TBARS	CAT	SOD	GST	NPSH
3 rd day	Control	8.53 ± 0.97 ^a	1.65 ± 0.26 ^a	16.61 ± 1.91 ^{ab}	0.36 ± 0.04 ^a	99.71 ± 9.05 ^a
	Pulsed magnetic field	8.20 ± 1.49 ^a	1.96 ± 0.40 ^a	18.47 ± 2.38 ^a	0.31 ± 0.18 ^a	129.23 ± 9.77 ^a
7 th day	Control	10.94 ± 1.18 ^a	1.94 ± 0.33 ^a	18.53 ± 2.20 ^a	0.58 ± 0.05 ^a	129.60 ± 9.95 ^a
	Pulsed magnetic field	6.48 ± 1.44 ^{*a}	1.29 ± 0.15 ^a	13.15 ± 1.72 ^a	0.41 ± 0.11 ^a	99.66 ± 9.64 ^a
14 th day	Control	9.04 ± 0.81 ^a	1.52 ± 0.38 ^a	10.92 ± 1.13 ^b	0.77 ± 0.13 ^a	98.42 ± 10.51 ^a
	Pulsed magnetic field	7.50 ± 1.38 ^a	1.44 ± 0.44 ^a	14.70 ± 1.73 ^a	0.62 ± 0.11 ^a	116.17 ± 11.53 ^a

TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances ($\mu\text{mol/g}$ tissue). SOD - Superoxide dismutase (SOD units/g tissue), CAT - Catalase ($\rho\text{mol/g}$ tissue), GST - Glutathione S-transferase ($\rho\text{mol/min/g}$ tissue), NPSH- Non-protein thiols (nmol/g tissue). Values are represented as the man \pm SEM. * Represents differences from the control at the same time. Lowercase letters represent differences in the same group at different times.

Table 3- Biomarkers of oxidative stress in the liver.

Time	Treatments	Protein	TBARS	CAT	SOD	GST	NPSH
3 rd day	Control	7.88 ±	1.28 ±	9.34 ±	10.30 ±	5.59 ±	8.37 ±
		0.39 ^a	0.08 ^a	0.50 ^a	0.82 ^a	0.51 ^a	0.53 ^a
	Pulsed magnetic field	8.81 ±	1.33 ±	10.00 ±	11.80 ±	4.60 ±	7.23 ±
		0.18 ^a	0.11 ^a	1.33 ^a	1.04 ^a	0.47 ^a	0.49 ^a
7 th day	Control	6.68 ±	1.73 ±	12.73 ±	17.45 ±	5.15 ±	9.70 ±
		0.33 ^a	0.21 ^a	1.64 ^a	1.20 ^b	1.13 ^a	0.61 ^a
	Pulsed magnetic field	6.50 ±	1.75 ±	13.04 ±	16.34 ±	4.72 ±	10.93 ±
		0.27 ^a	0.14 ^a	1.46 ^a	0.79 ^b	0.97 ^a	0.49 ^b
14 th day	Control	7.94 ±	1.50 ±	9.85 ±	14.63 ±	3.69 ±	8.24 ±
		0.28 ^a	0.07 ^a	1.59 ^a	1.15 ^{ab}	0.64 ^a	0.34 ^a
	Pulsed magnetic field	7.34 ±	1.53 ±	9.22 ±	14.14 ±	4.79 ±	10.29 ±
		0.45 ^a	0.19 ^a	1.07 ^a	0.86 ^{ab}	0.86 ^a	0.49 ^b

TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances ($\mu\text{mol/g}$ protein). SOD - Superoxide dismutase (SOD units/g protein), CAT - Catalase ($\mu\text{mol/g}$ protein), GST- Glutathione S-transferase ($\mu\text{mol/min/g}$ protein), NPSH- Non-protein thiols (nmol/g protein). Values are represented as the mean \pm SEM. * Represents differences from the control group at the same time. Lowercase letters represent differences in the same group at different times.

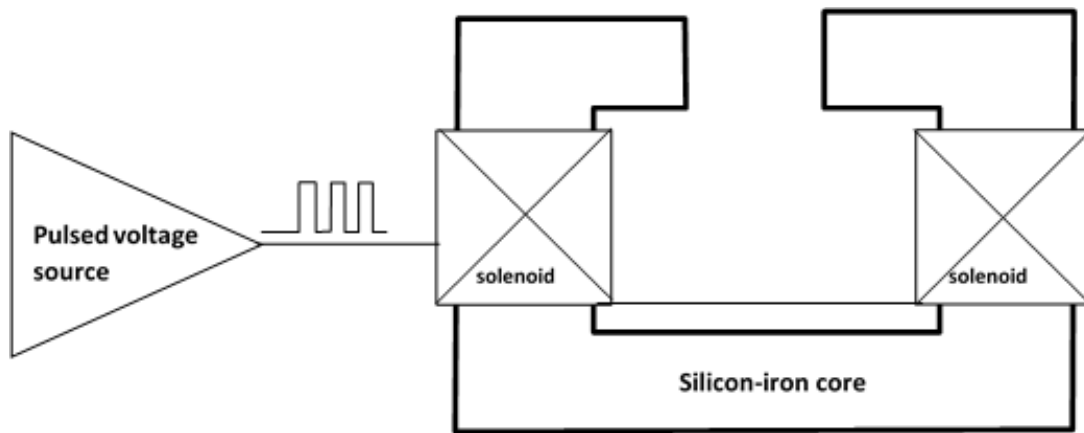
Fig. 1.

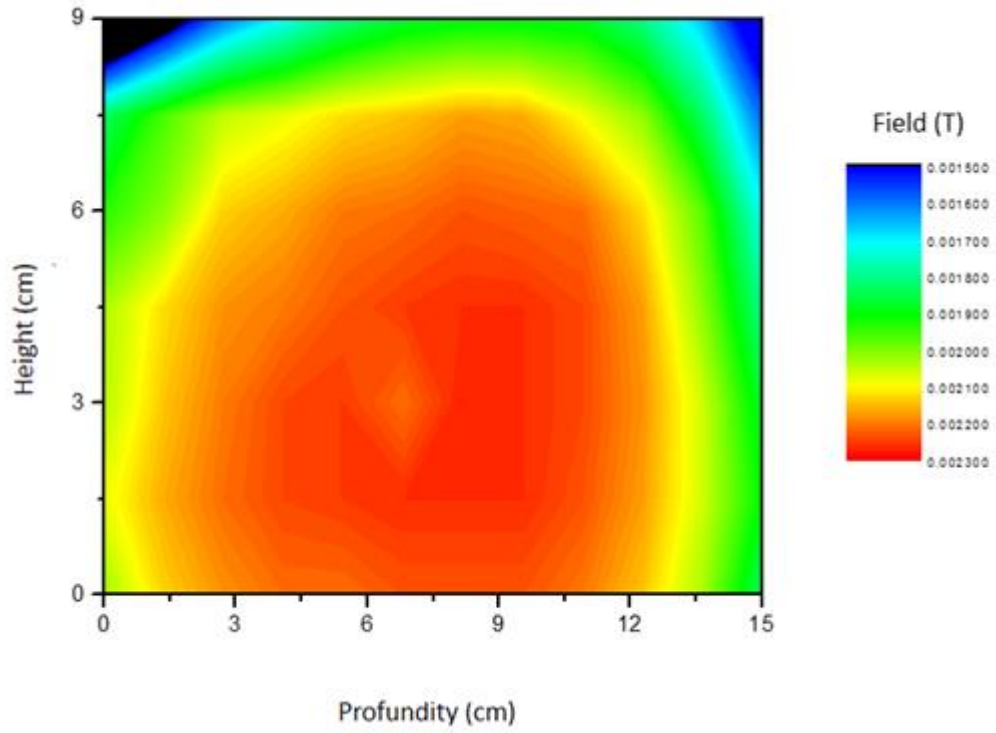
Fig. 2.

Fig. 3.

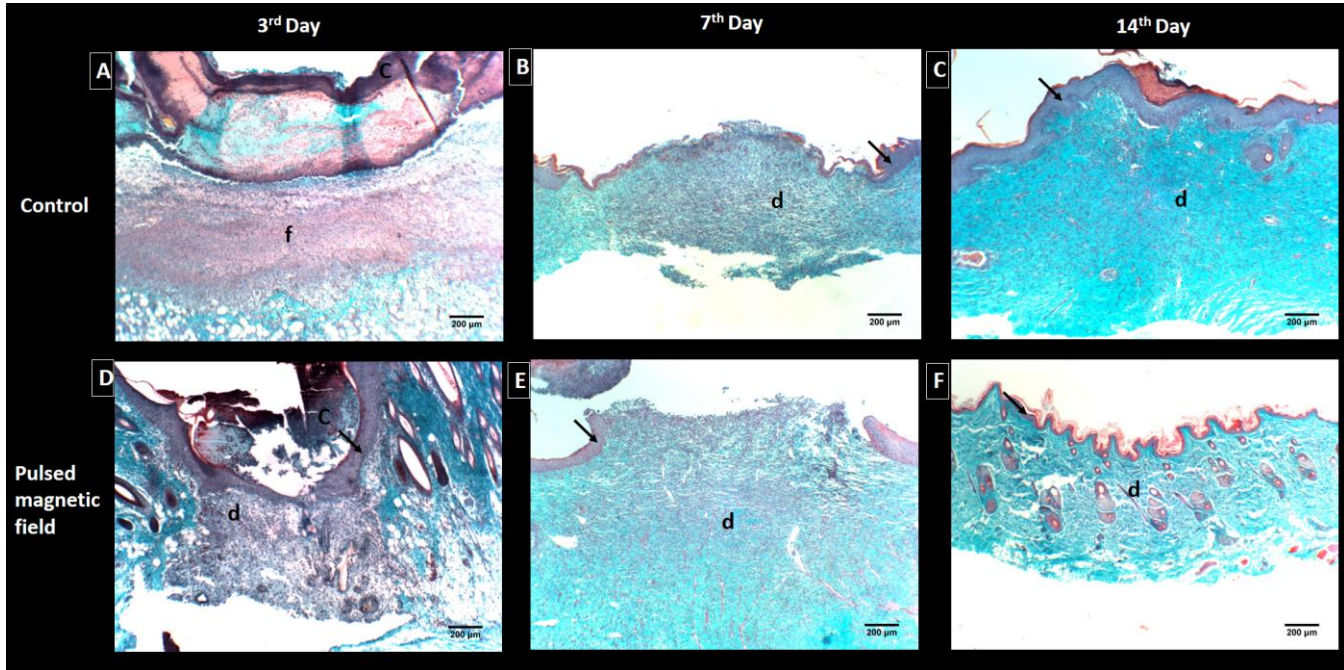


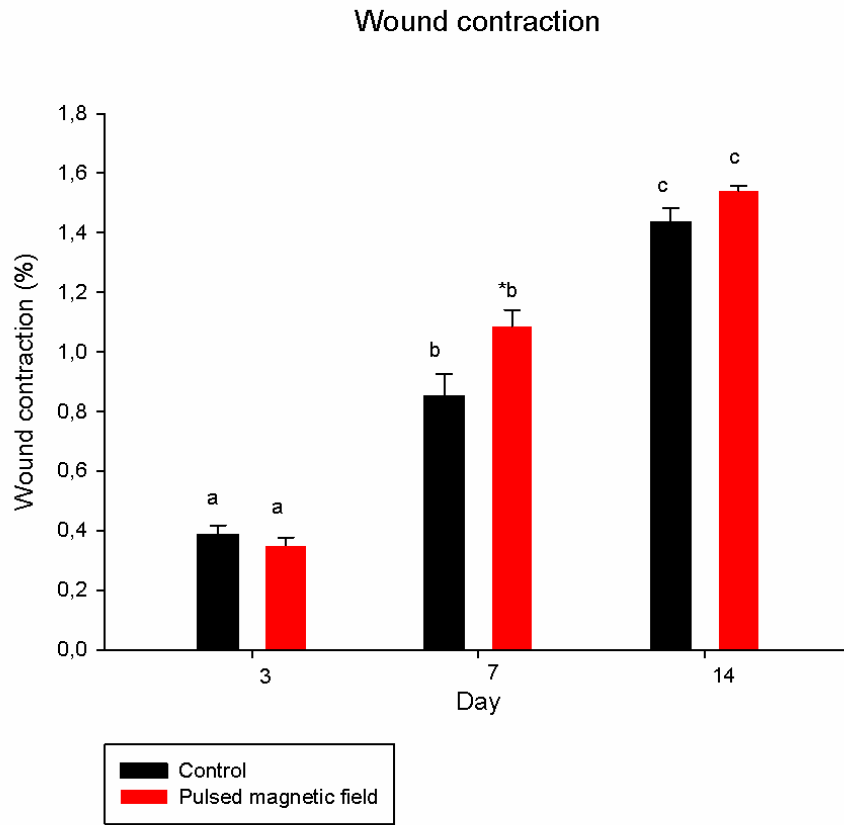
Fig. 4.

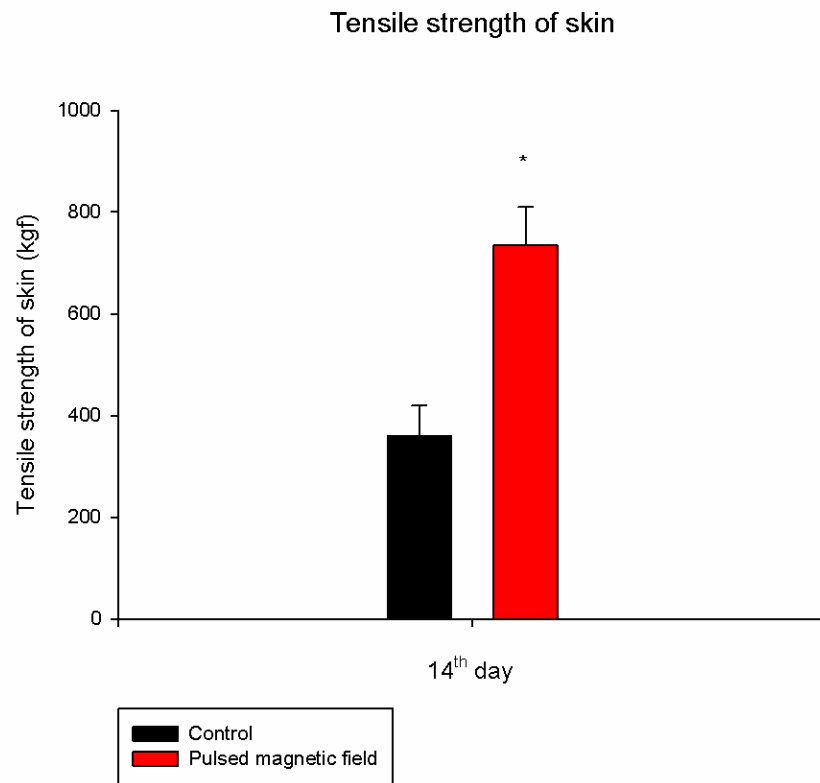
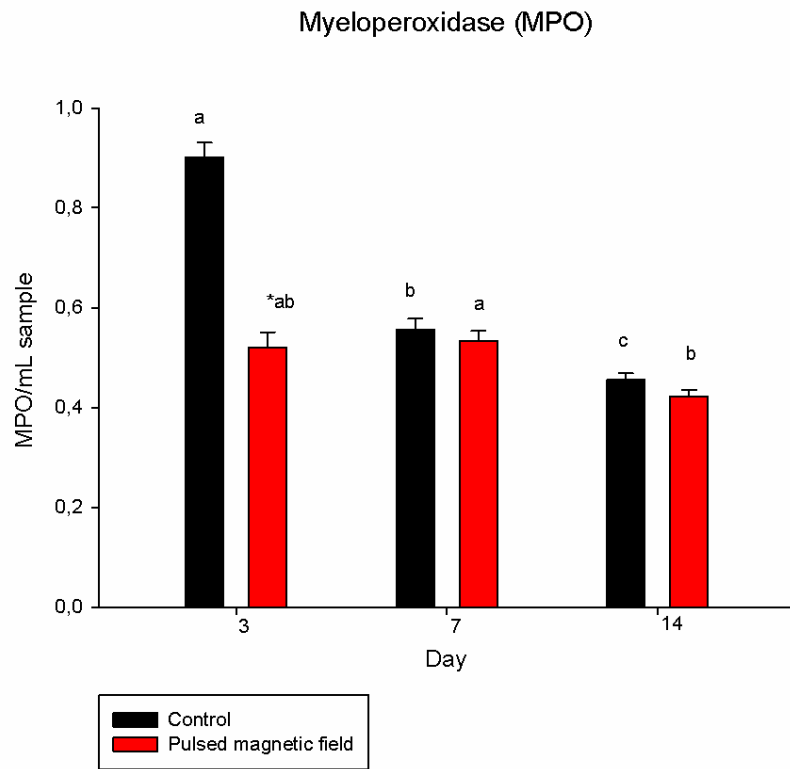
Fig. 5.

Fig. 6.

4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e nas condições experimentais do presente trabalho, podemos concluir que o campo magnético pulsado de 23 mT, 62Hz, por 30 minutos ao dia, durante 14 dias, foi efetivo na cicatrização de feridas cutâneas, diminuiu a infiltração de células inflamatórias na fase inicial, auxiliou a remodelagem e aumentou a força de tração da pele cicatrizada. Além disso, essa intensidade, frequência e duração de exposição, mostram-se seguras para a manutenção da homeostase redox, não ocasionando estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

ÁLVARES, R. F. E.; GARCÍA, J. L. M.; BLANCO, J. F. N. Tratamiento magnético de los traumatismos no complicados. Reportes preliminares. **Revista Cubana de Medicina General Integral**, v. 23, n. 4, 2007.

ALY, N. et al. Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 7-12, 2010.

ARWERT, E. N.; HOSTE, E.; WATT, F. M. et al. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 3, p. 170-80, 2012.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, 2005.

BARBOSA, E.; MOREIRA, E. A. M.; FAINTUCH, J.; PEREIRA, M. J. L. Suplementação de antioxidantes: enfoque em queimados. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 6, p. 693-702, 2007.

BEANES, S.R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. The phases of cutaneous wound healing. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.5, n.21, 2003.

BENNETT, M. F. Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging? **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 13, p. 15-19, 2008.

BERTOLINO, G. et al. Macroscopic and histological effects of magnetic field exposition in the process of tissue reparation in Wistar rats. **Archives of Dermatology**, v. 298, p. 121-126, 2006.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BONDY S.C.; LE BEL C.P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 14, p. 633-642, 1993.

BORGES, E. L. Evolução da cicatrização. In: BORGES, E. L.; SAAR, S. R. C.; MAGALHÃES, M. B. B.; GOMES, F. S. L.; LIMA, V. L. A. N. **Feridas: como tratar**. 2ª ed. Belo Horizonte: Coopmed, p.31-43, 2008.

BRASKÉN, P. Healing of experimental colonic anastomosis. **The European journal of surgery. Supplement**, v. 66, p. 1-51, 1991.

CALIXTO, J.B. et al. Antiinflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of proinflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CALLAGHAN, M. et al. Pulsed Electromagnetic Fields Accelerate Normal and Diabetic Wound Healing by Increasing Endogenous FGF-2 Release. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 121, p. 130-141, 2008.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CANDIDO, L. C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo: Editora SENAC-SP, 2001.

CANSEVAN, A. G.; COSKUN, S.; SEYHAN, N. Effects of various extremely low frequency magnetic fields on the free radical processes natural antioxidant system and respiratory burst system activities in the heart and liver tissues. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 45, p. 326-331, 2008.

CARRUTHERS, J.; CARRUTHERS, A. Electromagnetic Radiation and Wound Healing. **Dermatologic surgery**, v. 38, p. 451-453, 2012.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-601, 1979.

CLARK, R.A.F. Wound repair: overview and general considerations. In: CLARK, R. A. F. (ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2ª ed. Plenum Press, p. 3 -50, New York, 1996.

COCHARD LR. **Atlas de embriologia humana de Netter**. Porto Alegre: Artmed; 2003. p.27.

COMPORTI M. Lipid peroxidation, biopathological significance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 199–207, 1993.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 813 – 824, 2007.

DE MACEDO, J. L. S.; SANTOS, J. B. Complicações infecciosas em pacientes queimados. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 21, n. 2, p. 108-111, 2006.

DEBENEDICTIS, C. et al. Immune functions of the skin. **Clinical Dermatology**, v. 19, p. 573-85, 2001.

DENNING, M.F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1141-1146, 2004.

DIPLOCK, A.T. et al. Functional food science and defense against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, p. 77-112, 1998.

EMRE, M. et al. Oxidative Stress and Apoptosis in Relation to Exposure to Magnetic Field. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 59, p. 71-77, 2011.

ERASLAN, G. et al. Studies on antioxidant enzymes in mice exposed to pulsed electromagnetic fields. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 287-289, 2007.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Review Nutrition**, v. 18, p. 872-78, 2002.

FREINKEL, R.K.; WOODLEY, D.T. **The Biology of the Skin**. 1 ed. New York: The Parthenon Publishing Group, 2001.

FRIDOVICH, I. Superoxide and evolution. **Horizons in Biochemistry and Biophysics**, v.1, p.1-37, 1974.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia**. Editora Guanabara Koogan S. A., p. 253–259, Rio de Janeiro, 1999.

GLINKA M. et al. Influence of extremely low-frequency magnetic field on the activity of antioxidant enzymes during skin wound healing in rats. **Electromagnetic Biology & Medicine**, v. 32, p. 463-470, 2013.

GNIADDECKI, R. Regulation of keratinocyte proliferation. **General Pharmacology**, v. 30, p. 619-622, 1998.

GORACA, A.; CIEJKA, E.; PIECHOTA, A. Effects of extremely low frequency magnetic field on the parameters of oxidative stress in heart. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 61, p. 333-338, 2010.

GUTTERRIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, p. 129-135, 1990.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 715-725, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERRIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 1454-1468, 1999.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs & Aging**, v. 28, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. **Free Radical Research**, v.25, p.57-74, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERRIDGE, J. M. C. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4^a ed., New York: Oxford University Press, 2007.

HASHISH, A. H. et al. Assessment of biological changes of continuous whole body exposure to static magnetic field and extremely low frequency electromagnetic fields in mice. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 895-902, 2008.

JACOB, S. W.; FRANCONI, C. A.; LOSSOW, W. L. **Anatomia e fisiologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 80-85, 1990.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. 10^o ed. São Paulo: Manole, 1998.

LUNDBERG, C.; GERDIN, B. The role of histamine and serotonin in the inflammatory reaction in an experimental model of open wounds in the rat. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v. 8, n. 2, p 175-180, 1984.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C.C. The skin as a mirror of the aging process in the human organism - State of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Experimental Gerontology**, v. 42, p. 879-886, 2007.

MANNI, V. et al. Effects of extremely low frequency (50 hz) magnetic field on morphological and biochemical properties of human keratinocytes. **Bioelectromagnetics**, v. 23, p. 298-305, 2002.

MATIC, M. et al. Influence of different types of electromagnetic fields on skin reparatory processes in experimental animals. **Lasers in Medical Science**, v. 24, p. 321–327, 2009.

NAKASHIMA, I. et al. 4-Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 231–238, 2003.

NIJVELDT, R.J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418, 2001.

OHARA, A. **Radicais Livres: Bons, Maus e Naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006.

OLSSON, D. C. et al. Ultra-som terapêutico na cicatrização tecidual. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p. 1200-1207, 2008.

PARK, N. Y; LIM, Y. Short term supplementation of dietary antioxidants selectively regulates the inflammatory responses during early cutaneous wound healing in diabetic mice. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 1, 2011.

PAVANATO, M.A.; LLESUY, S.F. Espécies ativas de oxigênio e de nitrogênio. *In*: MARRONI, N.P. (org). **Estresse Oxidativo e Inflamação: dos Modelos Experimentais à Clínica**. Canoas: Ed. ULBRA, p. 12-24, 2008.

PÉREZ, G. A. La naturaleza, el hombre y el magnetism. **Revista Cubana de Medicina General Integral**, v. 18, p. 73-75, 2002.

REINKE, J. M.; SORG, H. 2012. Wound Repair and Regeneration. **European surgical research**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das Espécies Reativas de Oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, p. 133-149, 2005.

ROSS, R; ODLAND, G. Human wound repair: II Inflammatory cells, epithelialmesenchymal interrelations, and fibrogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 39, p. 152-168, 1968.

ROY, S. etal. Dermal wound healing is subject to redox control. **Molecular Therapy**, v. 13, p. 211–220, 2006.

RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RUSHTON, I. Understanding the role of proteases and pH in wound healing. **Nursing Standart**, v.21, n.32, p.68-74, 2007.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacology Research**, v. 58, n. 2, p. 165 – 171, 2008.

SCHAICH, K. M. Metals and lipid peroxidation. **Lipids**, v. 27, p. 209–218, 1992.

SEN, C.K.; ROY, S. Redox signals in wound healing. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1348 –1361, 2008.

SHALABY, T.; SHAWKI, M. Biophysical and biochemical changes in the characteristics of rat blood exposed to combined alternating and static magnetic fields (in vivo study). **Romanian Journal of Biophysics**, v. 16, p. 169-180, 2006.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, eds. **Oxidative stress**. London: Academic Press, p.1–7, 1985.

SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 667-675, 2004.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, p. 477-502, 2000.

STRAUCH B., et al. Pulsed Magnetic Fields Accelerate Cutaneous Wound Healing in Rats. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 120, p. 425-430, 2007.

THOMAS, J.A. Estresse oxidativo e defesa contra antioxidantes. In.: SHILS, M. E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**, v. 1, 9 ed, São Paulo: Manole, 2003.

THORNTON, F. J.; BARBUL, A. Healing in the gastrointestinal tract. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 549 – 573, 1997.

TIAN, J. et al. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. **ChemMedChem**, v. 2, n. 1, p. 129-136, 2007.

TOUMI H; BEST TM. The inflammatory reponse: friend or enemy for muscle injury? **British Journal Sport Medicine**, v. 37, n. 4, p. 284-286. 2006.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 835–870, 2003.

WLASCHEK, M.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. **Wound Repair and Regeneration**, v. 13, p. 452–461, 2005.

YAMAGUCHI, S. et al. Effects of pulsed magnetic stimulation on tumour development and immune functions in mice. **Bioelectromagnetics**, v. 27, n. 1, p. 64-72, 2006.

YU, P.B. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.74, p.139-162, 1994.