

Tratamento de feridas excisionais de coelhos com extrato de barbatimão associado a células mononucleares autólogas da medula óssea

[Treatment of excisional wound in rabbits with barbatiman extracts associated with autologous bone marrow mononuclear cells]

D.F. Rodrigues¹, F.F. Mendes², L.B. Menezes², W.L. Carvalho², S. Sá², J.A. Silva²,
L.A. Souza², L.A.F. Silva²

¹Universidade Federal do Pará – Castanhal, PA

²Universidade Federal de Goiás – Goiânia, GO

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar o processo de cicatrização de feridas de coelhos tratadas com extrato de barbatimão (*S. adstringens*) associado a células mononucleares autólogas da medula óssea (CMMO). Utilizaram-se 20 coelhos, distribuídos em quatro grupos: B, extrato de barbatimão; CB, CMMO com extrato de barbatimão; CS, CMMO com solução fisiológica; S, solução fisiológica. Foi avaliada a presença de crosta, hiperemia, secreção, hemorragia, reepitelização, área da ferida e tempo de cicatrização. No terceiro, sétimo, 14^o e 21^o dias pós-operatório, realizou-se a biópsia das feridas e avaliaram-se os indicadores dos processos de inflamação e de reparo, com destaque para o colágeno, na coloração picrossírius, bem como de proliferação celular, na coloração AgNOR. Houve maior deposição de fibras colágenas nos grupos B e CB (P=0,00003) e formação de crostas mais espessas no sétimo dia, com fibras colágenas mais organizadas no 21^o dia. Conclui-se que o barbatimão estimula a produção de fibras colágenas e promove a formação de crostas mais espessas sobre a ferida na fase inicial da cicatrização e, na fase de remodelação, favorece a orientação das fibras colágenas. Além disso, a associação desse fitoterápico com CMMO não estimula a cicatrização de feridas.

Palavras-chave: AgNOR, cicatrização, colágeno, *Stryphnodendron adstringens*, terapia celular

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the healing process of wounds of rabbits in response to treatment with barbatiman extract (*S. adstringens*) associated with autologous mononuclear bone marrow cells (BM-MNC). We used 20 rabbits, divided into four groups: B, 10% barbatiman extract with 9.48% of total tannins; CB, BM-MNC with barbatiman extract; CS, BM-MNC with NaCl 0.9% solution; S, NaCl 0.9% solution. Clinical evaluation was performed by observing the presence of crust, redness, discharge, bleeding, re-epithelialization, the wound area and healing time in days. In the third, seventh, 14th and 21st postoperative days wounds were biopsied for microscopic evaluation of inflammation and repair process indicators, especially collagen, in picrossirius staining, and cell proliferation, in AgNOR staining. There was a greater deposition of collagen fibers in groups B and CB (p=0.00003) on the seventh day and formation of thicker crusts, and more organized collagen fibers on the 21st day in these groups. In conclusion, in the initial phase of healing, barbatiman extract stimulates the production of collagen fibers and promotes the formation of more exuberant crusts on the wounds and remodeling phase favors the orientation of collagen fibers, but when combined with BMMC does not stimulate wound healing in rabbits.

Keywords: AgNOR, cell therapy, collagen, wound healing, *Stryphnodendron adstringens*

INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas consiste na perfeita e coordenada cascata de eventos moleculares, bioquímicos e celulares (Velnar *et al.*, 2009), e vários protocolos terapêuticos visam otimizar esse processo. Dentre estes, destacam-se o

desbridamento cirúrgico, a síntese, o uso de medicamentos alopáticos, o implante de enxertos ou biomateriais, a oxigenoterapia hiperbárica, a terapia celular (Günter e Machens, 2012) e a fitoterapia (Piriz *et al.*, 2014).

O fitoterápico composto pelo extrato da casca de barbatimão (*S. adstringens*) contém compostos

Recebido em 31 de outubro de 2016

Aceito em 3 de dezembro de 2016

E-mail: dan_rodrigues2@yahoo.com.br

fenólicos, denominados taninos, que conferem ação antimicrobiana, antioxidante e adstringente (Rodrigues *et al.*, 2013b) por se ligarem a proteínas e polissacarídeos, formando uma camada protetora sobre a lesão, e estimularem a reepitelização (Hernandes *et al.*, 2010).

A terapia com células mononucleares autólogas da medula óssea (CMMO) é uma alternativa promissora no auxílio à reparação tecidual (Akela *et al.*, 2012), por produzir e estimular fatores de crescimento e citocinas (Okuno *et al.*, 2011). Além disso, sua fração composta por células-tronco mesenquimais (CTM) pode se diferenciar em diversas linhagens teciduais (Branski *et al.*, 2009) e coordenar a atividade de células inflamatórias, inibir os efeitos de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral e interferon, e estimular a fagocitose. As CTM também favorecem a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa da cicatrização, pela liberação de fatores de crescimento, como o endotelial vascular, fibroblástico básico e de queratinócitos (Zahorec *et al.*, 2015). No tratamento de feridas, a terapia celular foi empregada com sucesso em estudos experimentais, pré-clínicos e clínicos, na forma de suspensão ou associada a *scaffolds* (Branski *et al.*, 2009).

Como alguns estudos demonstraram o favorecimento da cicatrização de feridas pelo uso de barbatimão (Coelho *et al.*, 2010; Minatel *et al.*, 2010) e de CMMO (Lu *et al.*, 2011; Akela *et al.*, 2012), acredita-se que a associação dessas terapias possa otimizar o processo cicatricial. Este estudo objetivou avaliar a cicatrização de feridas cutâneas excisionais de coelhos, tratadas com extrato de barbatimão (*S. adstringens*) associado às CMMO, por meio de análises clínicas, histológicas e histoquímicas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – UFG, protocolo nº 026/2012. Foram utilizados 20 coelhos hípidos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, com \pm seis meses de idade e peso médio de 3kg. Os animais foram distribuídos em quatro grupos ($n=5$), conforme o tratamento das feridas: B, extrato de barbatimão (extrato glicólico da casca de barbatimão a 10%, Animalle Farmácia de Manipulação Veterinária, Brasil); CB, CMMO

associadas ao extrato glicólico da casca de barbatimão a 10%; CS, CMMO associadas à solução fisiológica (Solução de NaCl a 0,9%, Eurofarma Laboratórios Ltda., Brasil); e S, solução fisiológica (grupo controle). O extrato de barbatimão empregado possuía a seguinte caracterização físico-química: pH=4,34, densidade=42,08g/L, teor de sólidos=4,82%, fenóis totais=10,29% e taninos totais=9,48%.

Para a coleta de CMMO, os animais receberam 2mg/kg de cloridrato de tramadol, por via intramuscular, como medicação pré-anestésica, seguida da anestesia dissociativa, com 30mg/kg de cloridrato de cetamina associado a 5mg/kg de cloridrato de xilazina, por via intramuscular. Realizaram-se tricotomia e antissepsia da região do tubérculo umeral e procedeu-se à coleta e ao isolamento das CMMO, fundamentadas no estudo de Oliveira *et al.* (2011), com adaptações, incluindo o emprego de uma agulha hipodérmica 40x12mm para a punção medular, substituição do meio de cultivo Mesencult™ (Meio de cultivo celular, Stem cell Technologies, Brasil) por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Cultilab, Brasil) e a não utilização da solução de lise eritrocitária. A viabilidade celular obtida foi de 90% e estabeleceu-se a quantidade de 6×10^5 CMMO a serem aplicadas por ferida, nos grupos CB e CS, diluídas em 0,05mL de DMEM, em uma seringa de 1mL. As amostras foram mantidas refrigeradas em uma caixa de isopor com gelo até a sua aplicação, não excedendo duas horas.

Os animais foram novamente anestesiados conforme o protocolo anestésico anterior e realizaram-se a antissepsia e a tricotomia da região dorsal do tórax. Utilizou-se um *punch* circular metálico de 8mm para confeccionar quatro feridas excisionais na região dorsal torácica, com a distância mínima de 4cm entre elas e preservando-se a fáscia muscular. Cada ferida, escolhida por sorteio, representou um período de avaliação microscópica: terceiro, sétimo, 14º e 21º dia pós-operatório. Em seguida, aplicou-se a membrana semipermeável Tegaderm® (poliuretano, 3M™, Brasil) sobre a ferida, que permaneceu por 72h, fixada com quatro gotas de Vetbond (Adesivo de N-butil cianocrilato, 3M, Brasil), respeitando-se distância mínima de 2cm de cada ferida.

Tratamento de feridas...

Para a administração dos tratamentos, utilizou-se uma seringa de 1mL com agulha 13x0,45mm, que perfurou a membrana semipermeável e permitiu a deposição da solução sobre a ferida: nos grupos CB e CS, realizou-se uma única aplicação de 6×10^5 CMMO; nos grupos B e S, administraram-se 0,05mL da solução de barbatimão e de 0,05mL de solução fisiológica, respectivamente. Após 48 horas, administraram-se, de forma similar, as soluções de barbatimão nos grupos B e CB e a solução fisiológica nos grupos CS e S.

No terceiro dia pós-operatório, a membrana de poliuretano foi removida e utilizou-se uma seringa de 10mL com agulha 13x0,45mm para instilação por jateamento das soluções terapêuticas sobre as feridas: barbatimão, nos grupos B e CB, e solução fisiológica, nos grupos CS e S, até o 21º dia pós-operatório. Antecedendo a aplicação das soluções, gazes estéreis umedecidas na solução terapêutica foram empregadas para remover possíveis sujidades sobre as feridas. Para a analgesia pós-operatória, os animais receberam 2mg/kg de cloridrato de tramadol, por via subcutânea, a cada oito horas, por 72h. O colar elizabetano foi utilizado durante 21 dias.

Na avaliação clínica da reparação tecidual, realizada a cada 48h, avaliou-se a presença de hiperemia, hemorragia, secreção, crostas, reepitelização e área da ferida, por meio da captura de imagens com câmera digital (Coolpix L820, Nikon®, Japão). A área de cada ferida foi mensurada pelo programa Image J, versão 1.36b (National Institute of Health, Estados Unidos), como descrito por Rodrigues *et al.* (2013a).

No terceiro, sétimo, 14º e 21º dias do pós-operatório, os animais foram anestesiados, conforme o protocolo descrito anteriormente, para realização das biópsias. As amostras foram processadas e coradas pela técnica histológica de hematoxilina e eosina (HE) e histoquímicas de picrossírius (Junqueira *et al.*, 1979) e de AgNOR (Rech *et al.*, 2004) e examinadas por apenas um avaliador. Nas lâminas coradas em HE, utilizou-se o aumento de 100x e 400x, e observaram-se cinco campos por lâmina para avaliação descritiva de células polimorfonucleares e mononucleares, angiogênese, fibroplasia e reepitelização.

Para mensurar a área ocupada por fibras colágenas, foram fotografados cinco campos aleatórios das lâminas histológicas coradas em picrossírius, no aumento de 400x, em microscópio de luz polarizada, empregando-se o programa Image J (Rodrigues *et al.*, 2013a). Para a avaliação da proliferação celular, pela técnica de coloração AgNOR, foram capturadas três fotomicrografias da área da ferida e contaram-se aleatoriamente 40 células por fotomicrografia, no aumento de 400x, sob a microscopia de luz. Foi quantificado o número de proteínas AgNOR conforme descrito por Rebolledo Godoy *et al.* (2000), representadas pelo agrupamento de pontos escuros no interior do núcleo celular, e a porcentagem de células marcadas, representando as células em proliferação.

Foi empregada a análise da variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, no programa BioEstat 5.3 (Instituto Mamirauá, Brasil) com $P < 0,05$, para análise estatística das variáveis tempo de cicatrização em dias, área da ferida em cm^2 , área ocupada por fibras colágenas (%), células marcadas na coloração AgNOR (%) e número de proteínas AgNOR em unidades.

RESULTADOS

Na análise macroscópica das feridas, a hemorragia esteve presente até as primeiras 48h, e a presença de hiperemia foi discreta até o terceiro dia pós-operatório em todos os grupos. A presença de crosta foi observada a partir do quinto dia pós-operatório em todos os animais e apresentou-se mais evidente nos animais dos grupos B e CB (Fig.1). A reepitelização ocorreu a partir do nono dia em todos os grupos. A mensuração da área da ferida não apresentou diferença entre os tratamentos e o tempo médio de fechamento das feridas foi de 14,8 dias ($\pm 1,09$) no grupo B, 13,6 dias ($\pm 0,54$) no grupo CB, 14,6 dias ($\pm 1,34$) no grupo CS e de 15,6 dias ($\pm 1,09$) no grupo S, não havendo diferença entre os tratamentos.

Na avaliação histológica, nos animais dos grupos B e CB, observou-se uma camada eosinofílica mais espessa, de aparência proteica, sobre a ferida (crosta), em relação aos outros grupos. Abaixo dessa camada, no terceiro dia, notou-se uma concentração de células polimorfonucleares com intensidade predominantemente discreta e de células mononucleares com intensidade

moderada logo abaixo das células polimorfonucleares. Não houve diferença quanto à intensidade de polimorfonucleares entre os grupos, e a quantidade de polimorfonucleares decaiu com a evolução do processo cicatricial. Entre o terceiro e o 14º dia, houve aumento na quantidade de células mononucleares, com decréscimo no 21º dia.

A angiogênese foi identificada em todos os grupos do sétimo ao 14º dia pós-operatório com intensidade predominantemente moderada, e regrediu para discreta no 21º dia. A partir do sétimo dia pós-operatório, a fibroplasia apresentou-se com intensidade, variando de moderada a acentuada no 14º e 21º dias em todos os grupos. A reepitelização esteve presente, de forma parcial, no sétimo dia pós-operatório e, completa, no 14º dia.

Não se observou a presença de fibras colágenas nas feridas em todos os grupos no terceiro dia pós-operatório. No sétimo dia pós-operatório, os animais distribuídos nos grupos B e CB apresentaram maior quantidade de colágeno, 21,94% e 21,06%, respectivamente, em comparação aos grupos CS (12,11%) e S (13,28%), com diferença estatística, $P=0,00003$. Em todos os grupos, no 14º e 21º dias pós-operatório, houve um aumento expressivo da área ocupada por fibras colágenas, mas sem diferença entre os tratamentos. Foi observado que os animais alocados nos grupos B e CB apresentaram as fibras colágenas posicionadas de forma mais organizada no 21º dia em relação aos grupos CS e S (Fig. 1 e 2A).

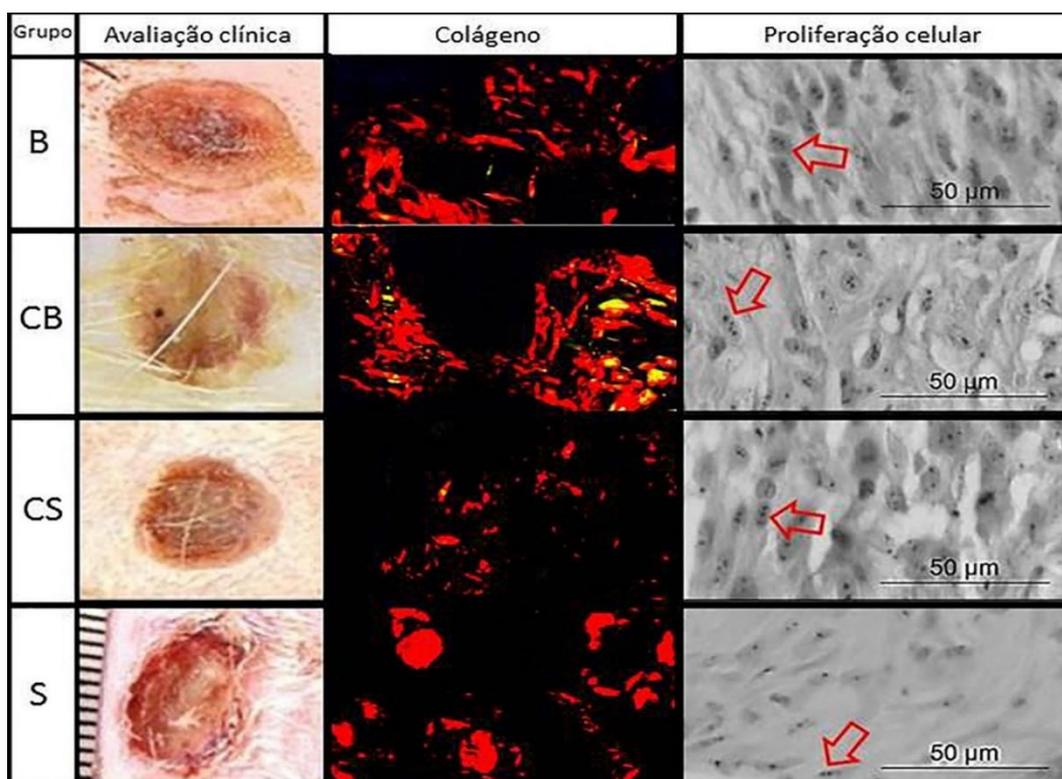


Figura 1. Representações dos achados clínicos e microscópicos no sétimo dia pós-operatório de feridas excisionais de coelhos, de acordo com tratamento (linhas) e período de avaliação (colunas): coluna avaliação clínica, presença de crostas mais exuberantes nos grupos B e CB; coluna colágeno, fotomicrografias de lâminas coradas pela técnica de coloração picrosírius, aumento de 400x em microscopia de luz polarizada, demonstrando áreas ocupadas por fibras colágenas representadas pelas cores que variam do verde ao vermelho intenso, com maior área ocupada por fibras colágenas nos grupos B e CB; coluna proliferação celular, fotomicrografias de lâminas coradas pela técnica de AgNOR, aumento de 400x em microscopia de luz (escala de cinza), demonstrando proteínas AgNOR representadas por pontos escuros formando os nucléolos (seta vermelha). Grupos: B (extrato de barbatimão); CB (CMMO com extrato barbatimão); CS (CMMO com solução fisiológica a 0,9%); e S (solução fisiológica).

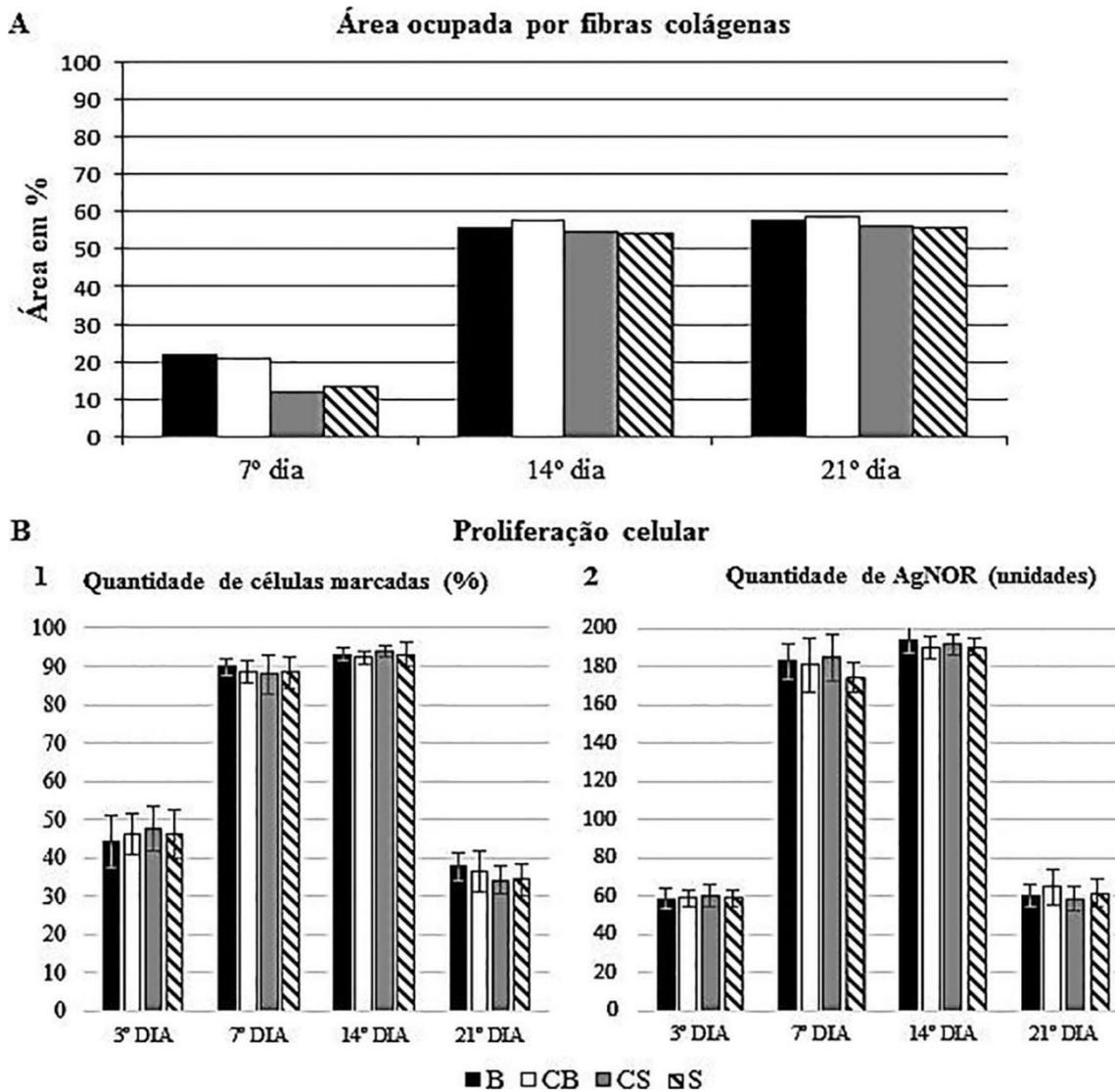


Figura 2. Representação gráfica dos resultados obtidos: área ocupada por fibras colágenas no sétimo, 14º e 21º dias pós-operatório (A), com diferença estatística no sétimo dia ($P=0.00003$); quantidade de células marcadas (%) pela técnica de coloração AgNOR (B1) e quantidade de grupamentos de proteínas AgNOR (B2), no terceiro, sétimo, 14º e 21º dias pós-operatório. Grupos: B (extrato de barbatimão); CB (CMMO com extrato barbatimão); CS (CMMO com solução fisiológica); e S (solução fisiológica). Eixo X: período de avaliação. Eixo Y: área ocupada por fibras colágenas (A); porcentagem de células marcadas (B1) e quantidade de células marcadas (B2).

No terceiro dia pós-operatório, foi observada uma pequena quantidade de células em proliferação celular e de proteínas AgNOR em todos os grupos, com aumento significativo no sétimo e no 14º dia pós-operatório. No 21º dia, houve redução expressiva dessas variáveis em todos os grupos e não houve diferença entre os tratamentos (Fig. 1, 2B1 e 2B2).

DISCUSSÃO

Neste estudo, o emprego do extrato de barbatimão com uma concentração de taninos próxima a 8% fundamentou-se na Farmacopeia Brasileira, que recomenda a concentração mínima de 8% de taninos no extrato para fins medicinais (Farmacopeia, 2010). Estudos sobre a cicatrização empregando o barbatimão comumente descrevem apenas a concentração

empregada, sem mencionar a concentração de taninos. Essa conduta pode gerar resultados conflitantes, visto que alguns trabalhos apontam o barbatimão como otimizador do processo de cicatrização (Coelho *et al.*, 2010; Minatel *et al.*, 2010), e outros não (Martins *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 2010). Portanto, acredita-se que as concentrações de taninos devem ser informadas em novos estudos envolvendo o barbatimão.

Não foi possível comprovar que as CMMO auxiliam na reparação tecidual neste estudo. Talvez a quantidade de 6×10^5 de CMMO administradas por lesão foi insuficiente para desencadear modificações teciduais no processo de reparação (Akela *et al.*, 2012). No entanto, no estudo de Treichel *et al.* (2011), empregando-se quantidades maiores de CMMO ($6,92 \times 10^6$ a $4,91 \times 10^7$), o favorecimento do processo de cicatrização também não foi observado. Assim, estudos sobre a quantidade mínima necessária de CMMO e até mesmo os métodos de aplicação devem ser conduzidos, possibilitando que novas propostas terapêuticas sejam avaliadas.

Mesmo não havendo diferença entre os parâmetros clínicos avaliados, é importante ressaltar que os grupos que receberam o extrato de barbatimão apresentaram a formação de uma crosta mais espessa, indicando que os taninos promoveram a precipitação de proteínas (Rodrigues *et al.*, 2013b) e permitiram a cicatrização abaixo dessa crosta.

Na coloração de HE, verificou-se que a cicatrização ocorreu no tempo fisiológico em todos os grupos (Velnar *et al.*, 2009). Na fase inflamatória, ficou evidente a presença da maior quantidade de células polimorfonucleares. A fase de proliferação mostrou a angiogênese e a fibroplasia de forma moderada. Na fase de remodelação, ficou nítida a maior organização do tecido cicatricial. A estimulação da reepitelização promovida pelo barbatimão, descrita por Hernandez *et al.* (2010), não foi constatada neste estudo e pode estar relacionada à concentração de taninos do extrato utilizado.

A ausência de fibras colágenas no terceiro dia pós-operatório está dentro da resposta fisiológica do organismo à lesão tecidual (Velnar *et al.*, 2009). Já a maior porcentagem de área ocupada por fibras colágenas nos animais alocados nos

grupos B e CB, no sétimo dia pós-operatório, pode ser atribuída ao barbatimão, pois não foi observada diferença entre esses dois tratamentos nesse período, mas sim em relação aos grupos que não receberam o extrato. Como essas características não foram observadas aos 14 e 21 dias pós-operatório, infere-se que o barbatimão atuou sobre a produção de fibras colágenas na fase inicial da cicatrização.

O efeito do barbatimão sobre a síntese de colágeno talvez esteja relacionado com os fibroblastos ativados por fatores de crescimento, como o fator derivado de plaquetas (PDGF), responsável por estimular a fibroplasia, além do fator de crescimento transformador β (TGF- β), responsável por estimular a síntese de colágeno para formação de tecido conjuntivo na lesão (Laureano e Rodrigues, 2011). Foi possível observar que os animais dos grupos B e CB apresentaram as fibras colágenas mais organizadas no 21º dia pós-operatório, o que pode representar o favorecimento da cicatrização, pois a disposição organizada das fibras colágenas confere à cicatriz maior resistência e melhor aparência estética (Kumar *et al.*, 2014).

O emprego de técnicas de coloração especiais para avaliação do colágeno, como o picrossírius, não foi encontrado em outros estudos envolvendo o barbatimão (Hernandez *et al.*, 2010; Minatel *et al.*, 2010), que descreveram achados macroscópicos ou histológicos empregando a coloração de hematoxilina e eosina, o que dificultou a comparação dos resultados deste estudo com outros. A avaliação da proliferação celular na coloração AgNOR foi uma tentativa de comprovar o efeito do extrato do barbatimão na cicatrização, fundamentando-se na descrição de que o barbatimão estimularia a proliferação de queratinócitos (Hernandez *et al.*, 2010). Dessa forma, investigou-se a influência desse fitoterápico na proliferação de outros tipos celulares fundamentais à cicatrização, como fibroblastos e células endoteliais, o que não ocorreu.

A quantidade baixa de células em proliferação e de proteínas AgNOR em todos os animais no terceiro dia pós-operatório caracterizou a fase inflamatória da cicatrização. Já no sétimo e 14º dias pós-operatório, a resposta tecidual representou a fase proliferativa da cicatrização,

que ocorre geralmente a partir do quarto dia e se prolonga até o 14º dia após a lesão, com aumento substancial na quantidade de fibroblastos e angiogênese que compõem o tecido de granulação. Como no 21º dia a quantidade de células em proliferação e de proteínas AgNOR decaiu, a fase de remodelação da cicatrização havia se instalado, por apresentar proliferação celular reduzida (Velnar *et al.*, 2009). Esperava-se que a terapia com CMMO pudesse estimular a proliferação celular, nos grupos B e CB, por serem apontadas como liberadoras de fatores de crescimento que estimulam a cicatrização (Okuno *et al.*, 2011), porém esse fenômeno não foi observado.

Correlacionando os dados de produção de fibras colágenas e de proliferação celular, supõe-se que o barbatimão atuou na estimulação da produção dessas fibras, visto que não houve o aumento da proliferação celular no sétimo dia pós-operatório em relação aos outros grupos. Nesse momento, a área ocupada por fibras colágenas apresentou-se em quantidades muito superiores nos animais dos grupos B e CB. Dessa forma, a maior deposição de fibras colágenas na fase inicial da cicatrização seria justificada pela resposta do processo cicatricial diante das substâncias naturais, que pode ocorrer em fases variadas da cicatrização (Santos *et al.*, 2014),

Embora as técnicas empregadas neste estudo tenham se apresentado adequadas para se analisar a cicatrização de feridas e das respostas teciduais, é preciso o desenvolvimento de pesquisas com técnicas mais específicas e sensíveis, em busca de eventos não identificados por esses exames, como os de biologia molecular, por exemplo *Western blot*, imunohistoquímica e a marcação de células-tronco mesenquimais, os quais poderiam elucidar melhor a atuação da terapia celular e do barbatimão na cicatrização.

CONCLUSÃO

Na fase inicial da cicatrização, o barbatimão estimula a produção de fibras colágenas e promove a formação de crostas mais espessas sobre a ferida e, na fase de remodelação, favorece a organização das fibras colágenas. No entanto, a associação desse fitoterápico às células mononucleares autólogas da medula óssea não otimizou a cicatrização.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (Fapeg), à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação-UFPA pelo apoio financeiro. À Farmácia de Manipulação Animalle (Goiânia - GO) e à Guabi Nutrição e Saúde Animal (Anápolis - GO), pelo provimento de insumos.

REFERÊNCIAS

- AKELA, A.; NANDI, S.K.; BANERJEE, D. *et al.* Evaluation of autologous bone marrow in wound healing in animal model: a possible application of autologous stem cells. *Int. Wound J.*, v.9, p.505-516, 2012.
- BRANSKI, L.K.; GAUGLITZ, G.G.; HERNDON, D.N. *et al.* A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing. *Burns*, v.35, p.171-180, 2009.
- COELHO, J.M.; ANTONIOLLI, A.B.; SILVA, D.N. *et al.* O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir.*, v.37, p.45-51, 2010.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. Brasília: Anvisa, 2010. v.2, 546p.
- GÜNTER, C.I.; MACHENS, H.G. New strategies in clinical care of skin wound healing. *Eur. Surg. Res.*, v.49, p.16-23, 2012.
- HERNANDES, L.; PEREIRA, L.M.S.; PALAZZO, F. *et al.* Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. *Braz. J. Pharmacol. Sci.*, v.46, p.431-436, 2010.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. *et al.* Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.*, v.11, p.447-455, 1979.
- KUMAR, N.; KUMAR, P.; BADAGABETTU, S.N. *et al.* Quantitative fraction evaluation of dermal collagen and elastic fibres in the skin samples obtained in two orientations from the trunk region. *Dermatol. Res. Pract.*, v.2014, p.1-7, 2014.

- LAUREANO, A.; RODRIGUES, A.M. Cicatrização de feridas. *Rev. Soc. Port. Dermatol. Venereol.*, v.69, p.355-367, 2011.
- LU, D.; CHEN, B.; LIANG, Z. *et al.* Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, v.92, p.26-36, 2011.
- MARTINS, O.S.; ALVES, A.L.G.; HUSSNI, C.A. *et al.* Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em equinos. *Arch. Vet. Sci.*, v.8, p.1-7, 2003.
- MINATEL, D.G.; Pereira, M.A.S.; CHIARATTI, T.M. *et al.* Estudo clínico para validação da eficácia de pomada contendo barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville)* na cicatrização de úlceras de decúbito. *Rev. Bras. Med.*, v.67, p.250-256, 2010.
- OKUNO, Y.; NAKAMURA-ISHIZU, A.; KISHI, K. *et al.* Bone marrow-derived cells serve as proangiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing. *Blood*, v.17, p.5264-5272, 2011.
- OLIVEIRA, B.J.N.A.; SOUZA, L.A.; Eurides, D. *et al.* Aislamiento, viabilidad y rendimiento de células mononucleares de medula ósea de conejos. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.*, v.45, p.113-118, 2011.
- PIRIZ, M.A.; LIMA, C.A.B.; JARDIM, V.M.R. *et al.* Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.16, p.628-636, 2014.
- REBOLLEDO GODOY, M.R.; REBOLLEDO GODOY, A.P.; OEHMICHEN, M. AgNORs during the process of wound healing. Time dependency as evaluated in vital and postmortem biopsy. *Int. J. Leg. Med.*, v.113, p.244-246, 2000.
- RECH, R.R.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS, G.D. *et al.* Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p.441-448, 2004.
- RODRIGUES, D.F.; MENDES, F.F.; DIAS, T.A. *et al.* O programa Image j como ferramenta de análise morfométrica de feridas cutâneas. *Encicl. Biosfera*, v.9, p.1955-1963, 2013a.
- RODRIGUES, D.F.; MENDES, F.F.; NORONHA FILHO, A.D.F. *et al.* O extrato da casca de barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, na cicatrização de feridas em animais. *Encicl. Biosfera*, v.9, p.1583-1601, 2013b.
- SANTOS, J.A.A.; SOUSA, M.F.A.M.; SILVA, E.L.V.; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A. Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.6, p.637-643, 2014.
- TREICHEL, T.L.E.; CUNHA, M.G.M.C.M.; CUNHA, J.P.M.C.M. *et al.* Transplante de fração total de células mononucleares ou fração vascular estromal associada à membrana celulósica em feridas cutâneas experimentais de coelhos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.48, p.62-72, 2011.
- VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.*, v.37, p.1528-1542, 2009.
- ZAHOREC, P.; KOLLER, J.; DANISOVIC, L.; BOHAC, B. Mesenchymal stem cells for chronic wounds therapy. *Cell Tissue Bank*, v.16, p.19-26, 2015.