

**CENTRO ALPHA DE ENSINO  
ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE HOMEOPATIA  
ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO**

**AÇÃO DO *SYMPHYTUM OFFICINALE*  
HOMEOPÁTICO E FITOTERÁPICO NA REPARAÇÃO ÓSSEA:  
ANÁLISE MICROSCÓPICA.**

**SÃO PAULO  
2014**

**ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO**

**AÇÃO DO *SYMPHYTUM OFFICINALE*  
HOMEOPÁTICO E FITOTERÁPICO NA REPARAÇÃO ÓSSEA:  
ANÁLISE MICROSCÓPICA.**

Monografia apresentada a ALPHA/APH  
como Exigência para obtenção do título de  
Especialista em Homeopatia.

Orientador: Dr. Marcelo Pustiglione

SÃO PAULO

2014

Brandão, Adriana Aigotti Haberbeck

Ação do *Symphytum officinale* homeopático e fitoterápico na reparação óssea: Análise microscópica / Adriana Aigotti Haberbeck Brandão.

São Paulo, 2014.

62f.; 30 cm; il.

Monografia – ALPHA/APH, Curso de Pós Graduação em Homeopatia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Pustiglione

1. *Symphytum officinale*.
2. Confrei.
3. Homeopatia.
4. Fitoterapia.
5. Reparação óssea.
6. Microscopia.

Dedico esta monografia a DEUS que me deu vida, saúde, disposição, determinação e capacidade para elaborar este estudo.

Agradeço imensamente e de coração,  
aos ratinhos que deram sua vida para essa pesquisa,  
aos alunos e amigos que me ajudaram a preparar o material e a fazer as avaliações,  
em especial a Ana Paula de Lima, Vitor Hugo Farina e Ana Lourdes Machado,  
a minha mãe e a meu pai que sempre me apoiaram,  
aos meus filhos que me ajudaram em etapas de cansaço,  
ao meu marido pelo carinho e paciência durante o curso de homeopatia.

## Resumo

O *Symphytum officinale* ou confrei é uma planta medicinal usada no tratamento auxiliar da consolidação de fraturas. Entretanto, casos de intoxicação hepática pela planta levaram a proibição de seu uso interno. Este fato justifica a avaliação da formulação homeopática. Os relatos de sua aplicação são basicamente populares e clínicos e existe pouca literatura científica investigando sua ação na reparação óssea. Este estudo avaliou a ação do *Symphytum officinale* na reparação de lesões ósseas em tíbia de ratos, através de análise microscópica. Foi comparada a ação do extrato fitoterápico 500mg/Kg/dia, da formulação homeopática de 6CH dois glóbulos/dia e de um placebo controle. Os tratamentos com *Symphytum officinale* em ambas as formulações estimularam a reparação óssea. O medicamento fitoterápico *Symphytum officinale* estimulou formação de tecido osteocondral e de tecido ósseo periosteal. O medicamento homeopático *Symphytum officinale* 6CH apresentou formação de osso na cavidade medular alguns dias mais tardia que o fitoterápico, estimulou a formação de tecido ósseo periosteal e apresentou remodelação óssea mais rapidamente. São necessários mais estudos analisando os efeitos do *Symphytum officinale* homeopático no reparo ósseo.

Palavras chave: 1. *Symphytum officinale*. 2. Confrei. 3. Homeopatia. 4. Fitoterapia. 5. Regeneração óssea. 6. Microscopia.

## **Abstract**

*Symphytum officinale* (Comfrey) is a medicinal plant used in the treatment of fractures consolidation. However, reports of hepatic intoxication after consuming Comfrey led to prohibiting its internal use. Taking into account this aspect the homeopathic formulation of *Symphytum officinale* should be investigated. There are few scientific reports about its effects on bone repair. This study evaluated the effects of *Symphytum officinale* on bone regeneration in rat's tibiae, by microscopic analysis. It was compared the effect of the Phytotherapeutic (Phy) *Symphytum officinale* 500mg/Kg/day, of the Homeopathic (H) *Symphytum officinale* 6CH two globules/day, and of a control placebo. Both the homeopathic and the phytotherapeutic medicine stimulated bone repair. Phy showed more periosteal bone and cartilage formation. Homeopathic *Symphytum* stimulated bone formation in the medullary cavity some days later than Phy. It also stimulated periosteal bone formation and had a more intense bone remodeling. Further studies are necessary to evaluate the homeopathic *Symphytum officinale* effects on bone regeneration.

*Key words:* 1. *Symphytum officinale*. 2. Comfrey. 3. Homeopathy. 4. Phytoterapy. 5. Bone regeneration. 6. Microscopy.

## **Sumário**

Introdução	6
Proposição	8
Revisão de literatura	9
Material e Métodos	17
Resultados	26
Discussão	48
Conclusão	57
Referências	58

## Introdução

A participação das fraturas ósseas na saúde é significativa. Felizmente, a maioria das fraturas é regenerada sem muitas complicações. Entretanto, estima-se que 5 a 10% destas desenvolvam problemas. A reparação de lesões ósseas causadas por fraturas, traumatismos, processos infecciosos, neoplasias, intervenções cirúrgicas e outros agentes, representa ainda um grande desafio em procedimentos médicos e odontológicos. Trata-se de um processo complexo que requer a interação de muitos fatores, incluindo uma resposta inflamatória equilibrada, o recrutamento e ação harmoniosa de células com diferenciação específica, o controle de infecção e outros. Mediante ação inadequada ou interrompida destes fatores a reparação pode ser prejudicada e ocorrer com atraso ou resultar em uma falta de união do osso ou em uma união fibrosa (VICTORIA et al., 2009). Por isso justifica-se a importância de estudos visando agentes farmacológicos que facilitem a regeneração óssea.

As desigualdades sociais e regionais em nosso país deixam uma parcela da população sem a possibilidade de realizar os tratamentos propostos pelo estado atual da ciência nas diversas doenças que atingem o ser humano. Por isso ocorre a necessidade de ampliar as medidas terapêuticas, buscando avaliar a eficácia e riscos de tratamentos mais acessíveis, como objetivo de realizar uma inclusão social e de oferecer aos cidadãos a possibilidade de um tratamento adequado e seguro. A homeopatia e a fitoterapia representam alternativas de tratamento importantes nessa direção.

Entre os medicamentos homeopáticos e fitoterápicos com importante ação regeneradora em tecido ósseo podemos citar o *Symphytum officinale* L. ou confrei.



Esta é uma planta conhecida e utilizada há muito tempo como cicatrizante para unir bordas de feridas, na consolidação de fraturas e no tratamento de traumatismos em ossos, perióstio, tendões, ligamentos e articulações (CARVALHO, 2004; TYLER, 1992; VIJNOVSKY, 1992).

No entanto, os relatos sobre sua aplicação terapêutica, independente de ser como formulação fitoterápica ou homeopática, são baseados principalmente em informações populares e em casos clínicos, e pouca literatura científica demonstra ou avalia sua ação. Assim, a investigação científica deste medicamento na regeneração óssea é de grande utilidade, fato reforçado por ser este um medicamento alternativo de baixo custo e de fácil acesso à população.

Além disso, devido ao risco de ser hepatotóxico, o confrei e suas formulações fitoterápicas tiveram o uso interno proibido. Não existem relatos demonstrando toxicidade em relação à formulação homeopática. Assim, é relevante a busca por uma forma racional de seu uso.

Este trabalho visa demonstrar microscopicamente a ação do confrei na regeneração óssea e poderá responder se o medicamento homeopático apresenta as mesmas propriedades que o fitoterápico na regeneração óssea.

## Proposição

Avaliar a ação do *Symphytum officinale* homeopático na regeneração óssea em comparação ao *Symphytum officinale* fitoterápico.

## Revisão de literatura

Entre os medicamentos homeopáticos e fitoterápicos com importante ação regeneradora em tecido ósseo podemos citar o *Symphytum officinale* L. ou confrei. Esta é uma planta pertencente à família *Boraginaceae*, conhecida há muito tempo pela medicina tradicional. É utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes para unir bordas de feridas, na consolidação de fraturas e no tratamento de traumatismos em ossos, perióstio, tendões, ligamentos e articulações (CARVALHO, 2004; TYLER, 1992; VIJNOVSKY, 1992).

Suas propriedades medicinais se devem à presença de alantoína, taninos e mucilagens. O confrei também contém saponinas, colina, açúcares, triterpenos, vitaminas, ácido fólico, aminoácidos, esteroides e ácidos orgânicos (GOLDMAN et al., 1985; VAZ e JORGE, 2006).

Além de seu efeito como planta medicinal, devido ao seu alto teor de nutrientes, vitaminas e sais minerais, foi utilizado como alimento e fertilizante. Entre todas as plantas do reino vegetal, o confrei é uma das que contém maior teor em proteínas, sendo conhecida como a planta mais rápida na produção de proteínas do mundo (CARVALHO, 2004).

Entretanto, entre os princípios ativos da planta encontram-se os alcaloides pirrolizidínicos (AP). O consumo crônico e sistêmico desta planta e de outras plantas que também apresentam AP pode desenvolver toxicidade hepática por exposição a altas doses desses alcaloides (POZETTI, 1991; RODE, 2002). Estes apresentam risco à saúde devido ao fato dos vertebrados terem a capacidade metabólica de converter muitos AP em pirróis tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, especialmente para o fígado (FIGUEIREDO e KAPLAN, 1997; STICKEL e SEITZ, 2000). A hepatotoxicidade por AP é bem estabelecida. É responsável pela doença

veno-oclusiva que é uma obliteração não trombótica de pequenos ramos venosos intra-hepáticos, a qual resulta em obstrução do fluxo venoso causando congestão hepática, fibrose e cirrose (GAYOTTO, 2001; STICKEL et al., 2005). Por esse motivo o confrei passou a ser proibido para uso interno. No Brasil essa proibição pelo Ministério da Saúde existe desde 1992 (BRASIL, 1992).

Muitos trabalhos que avaliaram a toxicidade do *Symphytum officinale* analisaram apenas os AP isolados, ou utilizaram a raiz da planta que é mais tóxica que as folhas (YEONG et al., 1991; YEONG et al., 1993; GUO et al., 2007; MEI et al., 2005; MEI et al., 2006). Tais fatos certamente interferem nos resultados relatados. Não existe consenso sobre a partir de que dose ocorre toxicidade e se existe uma dose segura para uso interno.

O *Symphytum officinale* como medicamento homeopático, se baseia no uso de pequenas doses em altas diluições. Devido à altíssima diluição espera-se que não seja hepatotóxico.

É necessário que se façam estudos sobre a possibilidade do delineamento do uso racional do *Symphytum officinale*, pois qualquer medicamento, seja homeopático ou alopático, apresenta reações adversas quando utilizado em doses e posologias incorretas.

Na formulação homeopática, considerando-se o tecido ósseo, pode ser indicado para tratamento de torções e lesões traumáticas, infecciosas ou cirúrgicas comprometendo ossos e perióstio e para consolidação de fraturas. Facilita a formação do calo ósseo e a reparação, além de diminuir a sintomatologia dolorosa (TYLER, 1992; VIJNOVSKY, 1992).

No final do século XVIII, o Dr. Christian Friedrich Samuel Hahnemann, na busca por uma terapêutica menos iatrogênica do que a medicina de sua época

propôs a Homeopatia. Esta é uma prática médica e terapêutica pelos semelhantes (*Similia Similibus Curentur*), segundo a qual a doença pode ser debelada pela aplicação de pequenas doses de uma substância medicinal capaz de induzir em indivíduos sadios sintomas semelhantes aos da doença a ser tratada. Esta hipótese já havia sido teorizada milênios antes por Hipócrates (CORRÊA et al., 1997; CORNILLOT, 2005).

Como algumas plantas e substâncias usadas para tratamento eram tóxicas, algumas vezes ocorriam efeitos adversos importantes. Hahnemann decidiu, então, diluir os medicamentos ao máximo, de maneira que sua toxicidade fosse diminuída, obtendo resultados promissores com a nova terapêutica (SIGOLO, 1996; CORRÊA et al., 1997).

Além da diluição, o medicamento homeopático passa por um processo chamado de succussão. Este método de diluição seguida de succussão recebeu o nome de dinamização. Este processamento leva a liberação do poder medicamentoso dinâmico, latente, das substâncias em estado natural e ponderáveis. O resultado final de cada etapa de dinamização é chamado de potência do medicamento. Os medicamentos homeopáticos podem ser preparados em diferentes potências segundo as dinamizações a que se submete o medicamento durante a sua manipulação farmacêutica. O poder medicamentoso alcançado atua no organismo doente devolvendo a Força Vital e fazendo com que este reaja. Assim, através de seus mecanismos naturais de defesa combate as doenças voltando a um equilíbrio dinâmico de saúde (HAHNEMANN, 1980; CASTRO, 1982; KOSSAK-ROMANACH, 2003).

A fitoterapia consiste em tratamento através de plantas. As propriedades terapêuticas de muitas plantas são tradicionalmente conhecidas desde a

antiguidade. Os medicamentos advindos de plantas já representaram o principal instrumento terapêutico e ainda atualmente são empregados por grande parte da população em todo o mundo e constituem objeto de estudos contínuos buscando novas atividades terapêuticas.

No entanto, existem diferenças entre o uso das plantas medicinais pelo conhecimento tradicional passado através de gerações, o uso pela fitoterapia ou ainda o uso como suplementos alimentares. A fitoterapia segundo a OMS deve ser considerada como uma modalidade terapêutica médica e seguir normativas reguladoras como a medicina oficial (Federici et al., 2005).

A necessidade do uso sustentável da biodiversidade em nosso país reforça a importância do estudo dos fitoterápicos. Muito embora se reconheça a legitimidade do conhecimento tradicional, uma planta para ser usada como fitoterapia deve ser cientificamente validada. Isso consiste de várias etapas que incluem plantio e coleta adequados, verificação se a atividade atribuída existe, avaliação dos riscos de seu uso, produção industrial, entre outros. É essa luta por uma fitoterapia dita científica que precisa ser perseguida pelas pessoas comprometidas com o estudo de plantas medicinais e o seu retorno social (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2011).

O tratamento de fraturas com *Symphytum officinale* ou confrei é conhecido e usado há muito tempo e faz parte da cultura popular. Justifica inclusive alguns nomes populares da planta como “consolidadora de ossos”, “erva da cicatrização”, (“*consuelda*” e “*unehuesos*” em espanhol).

Como já comentado, os relatos sobre aplicação terapêutica do *Symphytum officinale*, independente de formulação fitoterápica ou homeopática, são baseados principalmente em informações populares e em casos clínicos. Pouca literatura científica demonstra ou avalia sua ação especificamente na regeneração óssea.

O tratamento de fraturas com as formulações fitoterápicas do *Symphytum officinale* é relativamente pouco explorado. A maioria das referências relata o uso externo da planta em fraturas e em lesões associadas a entorses, luxações e traumatismos, principalmente através de acompanhamento clínico.

O tratamento de fraturas com as formulações homeopáticas do *Symphytum officinale* é ainda menos investigado. Nos livros de matéria médica e nos repertórios o *Symphytum* é indicado para tratar traumatismos em ossos, perióstio e tendões. Uma vez que facilita a formação do calo ósseo e diminui sensivelmente as dores agudas das fraturas, sua prescrição é considerada indispensável em todas as fraturas, em casos de falta de união das extremidades ósseas ou de atraso na consolidação do calo ósseo e também é útil em casos de lesões no perióstio (VIJNOVSKY, 1992). É considerado um remédio inestimável para fraturas e contusões, comparável a uma dádiva de Deus, com ação especial em fraturas que não se consolidam e em lesões no perióstio (TYLER, 1992).

O tratamento de fraturas com *Symphytum* homeopático é citado em livros específicos de homeopatia, baseado em efeitos teciduais e com muito poucos detalhes.

Raramente o assunto é abordado em artigos científicos. Recentemente começaram a surgir pesquisas sobre seu uso. Abaixo citamos alguns estudos abordando a ação deste medicamento na formulação homeopática.

Balducci-Roslindo *et al.*, em 1999, avaliaram a ação de um complexo homeopático contendo *Symphytum officinallis* e *Calendula officinallis* no processo de reparação em feridas de extração dentária. O grupo tratado mostrou alterações significativas desde os períodos iniciais, apresentando uma aceleração na

maturação do tecido ósseo neoformado, comprovando assim a eficácia da ação do complexo homeopático.

Chaves et al., em 2003, estudaram histológica e histomorfometricamente os efeitos do *Symphytum officinale* homeopático e do osso bovino granulado na reparação óssea na tíbia de ratos. Foram utilizados 60 ratos divididos em quatro grupos submetidos aos seguintes tratamentos: *Symphytum officinale* 6CH, osso bovino granulado, *Symphytum officinale* 6CH associado ao osso bovino granulado e grupo controle. As amostras do material foram examinadas aos 6, 12, 18, 24, 30 e 36 dias. Concluiu-se que o emprego do *Symphytum officinale* 6CH favoreceu a reparação óssea em todos os períodos de observação, obtendo os melhores resultados do experimento e estimulou a ósseo-integração das partículas de osso bovino.

A influência do *Symphytum officinale* 6CH homeopático na ósseo-integração foi avaliada em áreas ao redor de implantes de titânio. Foi realizado um estudo com 48 ratos divididos em dois grupos (controle e tratado). Cada animal recebeu um microimplante de titânio na tíbia. Os animais do grupo tratado receberam *Symphytum officinale* 6CH durante 7, 14, e 21 dias após a colocação do implante. Em radiografias obtidas no dia da colocação dos implantes (imagens iniciais) e no dia do sacrifício (imagens finais) foi realizada análise por subtração de imagens. A administração do *Symphytum officinale* homeopático promoveu aumento na densidade óssea radiográfica ao redor dos implantes (SAKAKURA et al., 2008).

Spin-neto et al., em 2010, avaliaram a influência do *Symphytum officinale* 6CH homeopático no torque de remoção e na densidade óssea radiográfica ao redor de microimplantes de titânio inseridos na tíbia de ratos. Foram utilizados 64 ratos, divididos em um grupo tratado e um grupo controle sem tratamento. Os animais



foram sacrificados aos 7, 14, 28 e 56 dias após a cirurgia. Foram analisadas uma radiografia inicial (logo após a cirurgia) e uma radiografia final (antes do sacrifício) por subtração de imagem. No período de 7 dias, o grupo tratado apresentou densidade óssea menor que o controle. Entretanto aos 14 e 56 dias, os animais tratados tiveram densidade óssea estatisticamente maior. A análise de remoção ao torque dos implantes no período de 14 dias foi maior no grupo tratado e nos períodos de 7, 28 e 56 não houve diferenças significativas. Os autores concluíram que o *Symphytum officinale* 6CH homeopático aumentou a formação óssea ao redor do implante de titânio nas fases iniciais de ósseo-integração.

No entanto, apesar de relatarem estímulo positivo de *Symphytum* homeopático no tecido ósseo, vários desses estudos não tratam de regeneração de lesão óssea ou de fratura propriamente dita e os seus métodos de análise são diferentes do que utilizamos.

A literatura tanto fitoterápica quanto homeopática menciona que o *Symphytum* influi no reparo ósseo, que estimula o reparo, diminui a inflamação e dor e favorece casos com reparação lenta. Porém, a maioria dos relatos menciona avaliações clínicas sendo ainda poucas as análises com comprovações ou demonstrações científicas detalhadas. Assim, as observações microscópicas analisadas neste projeto são válidas e originais.

O processo de reparação de lesões ósseas pode ser dividido em quatro estágios. O primeiro é o período inflamatório, que dura aproximadamente 1 semana, é caracterizado pelo desenvolvimento e reabsorção de hematoma seguido de formação de tecido de granulação. O segundo é o período de neoformação óssea primária e dura aproximadamente 2 a 3 semanas. É caracterizado pelas respostas proliferativas endosteal e periosteal, periféricas à injúria. Envolve também o

recrutamento de células tronco mesenquimatosas, a diferenciação destas e formação de uma mistura de ossificação intramembranosa e endocondral. O terceiro período é de reabsorção primária, dura 3 a 6 semanas, a cartilagem formada é calcificada e reabsorvida e tecido ósseo trabecular continua se formando. O último período é o de remodelação óssea secundária. Neste o osso trabecular é progressivamente remodelado e osso lamelar é formado até finalmente o osso lesionado readquirir as características que tinha antes da injúria (GERSTENFELD et al., 2005; GERSTENFELD et al., 2003).

Todas estas etapas com suas características podem ser acompanhadas microscopicamente servindo de base de análise objetiva do efeito de diferentes tratamentos.

## **Material e Métodos**

### **Comitê de Ética em Pesquisa**

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos em experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto teve aprovação fornecida pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - ICT - UNESP, sob o Protocolo nº 043/2007 – PA/CEP de 06 de novembro de 2007.

### **Seleção dos animais, manejo e divisão em grupos**

Para este estudo foram utilizados 72 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*), com aproximadamente 90 dias de idade e peso médio de 300g. Os mesmos foram nascidos e mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - ICT - UNESP. Foram acondicionados em caixas plásticas, em ambiente com temperatura média de 22 °C e umidade controlada, em ciclo de claro/escuro de 12 horas e alimentados com ração para roedores (Guabi Nutrilabor, Orlandia, SP, Brasil) e água ad libitum.

Aos 90 dias de idade foi realizada cirurgicamente uma lesão óssea monocortical na tíbia de todos os animais. A partir daí os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos de acordo com os seguintes tratamentos: grupo H - Homeopático tratado com *Symphytum officinale* 6CH, grupo F – Fitoterápico tratado com *Symphytum officinale* 500mg/kg e grupo C – Controle

tratado com veículo inerte. Foram eutanasiados seis animais de cada um dos três grupos nos períodos experimentais de 7, 14, 21, e 30 dias após a cirurgia.

## **Procedimento cirúrgico para realização das lesões ósseas**

Para a realização da cirurgia os animais foram anestesiados usando-se uma mistura de cloridrato de xilasina 2% (Anasedan®, Bayer, São Paulo, SP, Brasil), substância sedativa e relaxante muscular, com cetamina base (Francotar®), anestésico geral, na relação de 0,8:0,5ml. Esta mistura foi administrada na dose de 0,1ml/100g de peso corporal, por via intramuscular. Os ratos foram pesados para calcular a dose ideal de anestésico.

Após anestesia foi feita depilação manual das patas traseiras e antissepsia local com álcool iodado. Então a pele e o músculo da face lateral interna das patas traseiras foram incisados longitudinalmente com bisturi com lâmina nº 15. Os músculos foram afastados com espátula nº 7 para expor a face medial da diáfise da tíbia, região onde foi perfurada uma lesão de 2,5 mm de diâmetro, com broca esférica carbide nº 8. Durante a confecção da lesão foi mantida irrigação contínua com solução fisiológica para evitar aquecimento local. As perfurações foram realizadas por um operador calibrado, com manipulação delicada para evitar danos na cavidade medular e na cortical contralateral. Após a estabilização do coágulo sanguíneo na região da lesão óssea os músculos e a pele foram reposicionados e suturados com fio de seda nº 4 (Ethicon/Johnson & Johnson) (Figuras 1 e 2).

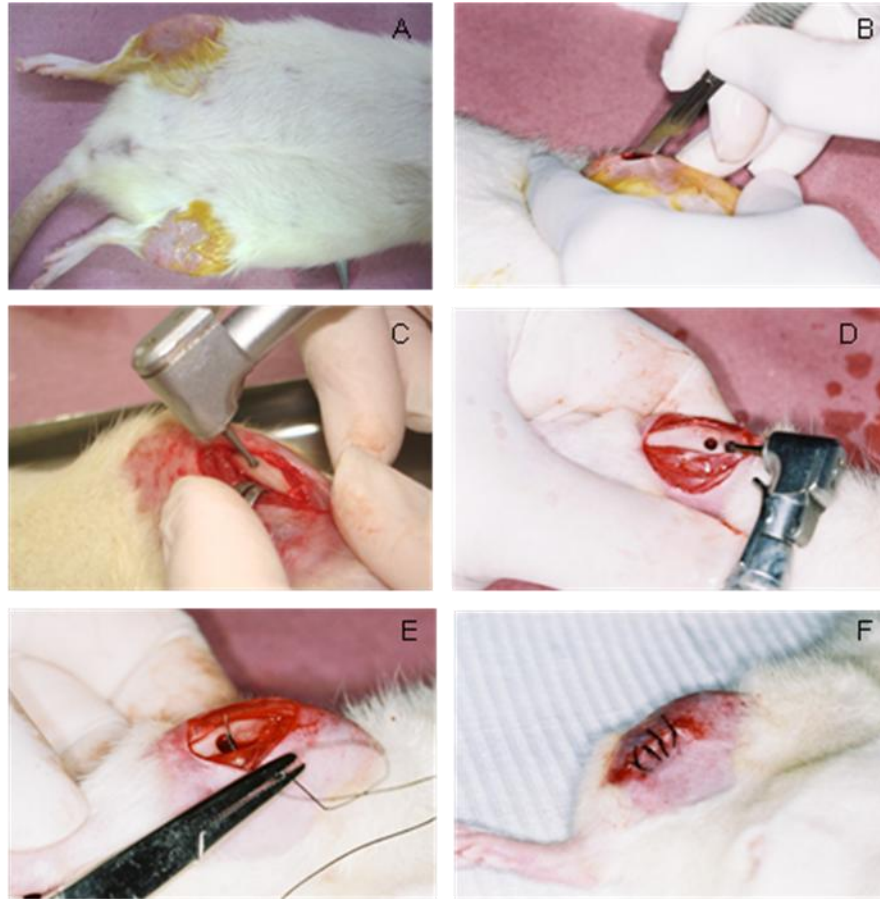


Figura 1 - Etapas do procedimento cirúrgico para confecção da lesão óssea na tíbia.

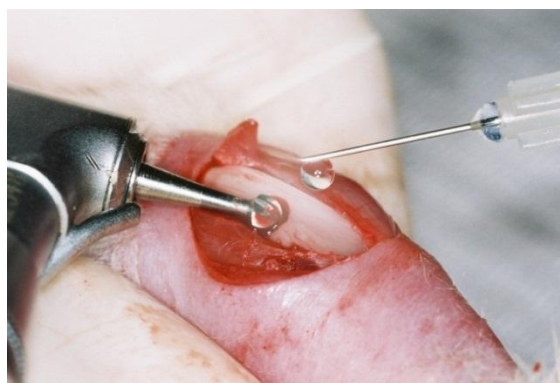


Figura 2 – Perfuração de uma lesão óssea monocortical, usando broca esférica de 2,5 mm, em baixa rotação, mantendo irrigação contínua com soro fisiológico.

As cirurgias foram realizadas em condições de esterilidade controlada. Os animais não mostraram sinais de estresse e de infecção no pós-operatório. Para este experimento os animais não receberam analgésicos, anti-inflamatórios ou antibióticos no pós-operatório para evitar uma possível influência destes medicamentos no processo de reparação óssea e também para evitar interação com o medicamento homeopático. Anti-inflamatórios podem interferir na evolução da reparação óssea e não existe consenso em relação a certos analgésico e antibióticos (MOUNTZIARIS, 2011).

### Tratamentos experimentais

Os diferentes tratamentos foram iniciados duas horas após a cirurgia, após recuperação da anestesia geral, e foram mantidos diariamente até o dia anterior ao da eutanásia.

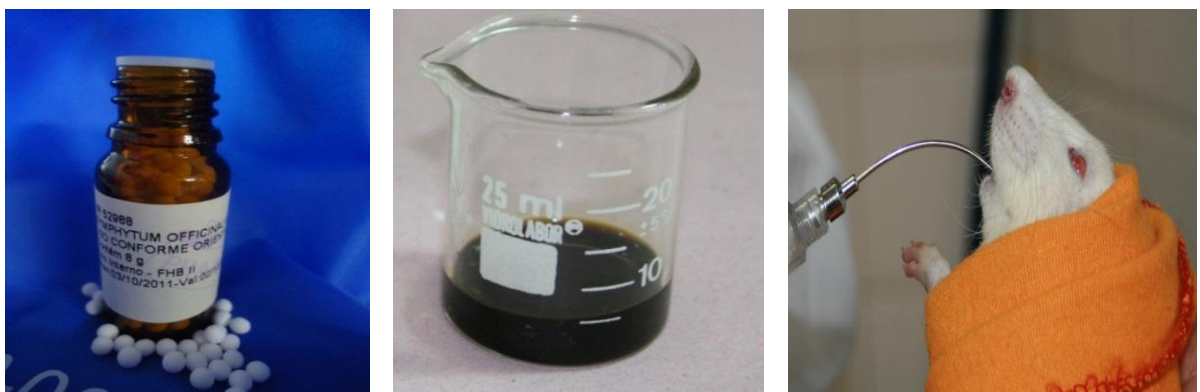


Figura 3- Da esquerda para direita: medicamento homeopático, medicamento fitoterápico, animal recebendo tratamento através de gavagem.

## **Tratamento homeopático**

Foram administrados a cada animal do grupo H - Homeopático, através de gavagem, 02 glóbulos de sacarose impregnados de *Symphytum officinallis* 6CH (Pharmaciantiga, São Jose dos Campos-SP), dissolvidos em 1 ml de água filtrada por dia.

## **Tratamento do grupo controle**

Foram administrados a cada animal do grupo C - Controle, através de gavagem, 02 glóbulos de sacarose inertes, sem medicamento homeopático ou fitoterápico (Pharmaciantiga, São Jose dos Campos-SP), dissolvidos em 1 ml de água filtrada por dia.

## **Tratamento fitoterápico**

Foram administrados a cada animal do grupo F - Fitoterápico, através de gavagem, 500 mg/Kg de extrato de *Symphytum officinale* por dia. Cada animal foi pesado semanalmente para cálculo da dose.

## **Preparo da droga fitoterápica**

O medicamento fitoterápico usado para o tratamento foi preparado a partir de folhas de confrei. O material vegetal foi coletado no sítio Pinheiros, localizado no bairro Vila Élvio, pertencente ao município de Piedade, no Estado de São Paulo e

identificado pelo Prof. Dr. Gokithi Akisue. Foi feita uma exsicata que foi depositada no Herbário de Fanerógamas do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo (USP), sob a identificação: G. Akissue 032 - SPF.

As folhas da espécie foram colhidas inteiras e secas naturalmente à sombra. Posteriormente, as folhas foram submetidas à secagem complementar em estufa em temperatura controlada de 45°C durante 72 horas. Após a secagem, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas e as partículas resultantes foram padronizadas a <20 Mesh.

Para a obtenção do extrato fluido das folhas da espécie foi empregado o Processo A da Farmacopéia Brasileira 2º ed. (1959) adaptado para as características do estudo. Assim, 1.000 g da droga vegetal pulverizada e padronizada (partículas < 20 Mesh), foram submetidas a intumescimento a temperatura ambiente (~25°C) em solução hidroetanólica 70% (v/v) por 30 minutos.

O material resultante do intumescimento foi acondicionado em um vaso percolador. Durante este procedimento foi tomado o cuidado de não se compactar o material excessivamente de modo a não criar resistência e/ou dificultar a passagem do solvente durante o processo de percolação, resistência esta, resultante do possível aumento da força de capilaridade frente à pressão hidrostática do sistema. À droga vegetal acondicionada no sistema para percolação foi adicionada solução hidroetanólica 70% (v/v) até cobrir 10 cm acima do nível da droga vegetal. O material ficou em repouso neste estado de maceração durante 24 horas. Então foi iniciado o processo de percolação com fluxo controlado de 25 gotas por minuto.

Foram recolhidos os primeiros 850 ml de extrato, o que correspondeu à primeira fração extrativa, a qual foi acondicionada e reservada em vidro âmbar bem fechado. Esta primeira fração extrativa foi armazenada em refrigerador à



temperatura de 8°C. A percolação foi continuada até o esgotamento da droga vegetal, mantendo-se o fluxo de 25 gotas por minuto até a sua conclusão.

Após o esgotamento da droga vegetal, a segunda fração extrativa obtida foi concentrada, em aparelho evaporador rotativo acoplado a vácuo, em temperatura de 45°C, e o procedimento foi concluído em aparelho de banho-maria, também em temperatura de 45°C, até se obter o volume final de 150 ml desta fração extrativa. Este volume foi acrescentado à primeira fração reservada, totalizando 1.000 ml de extrato fluido na proporção de 1:1 (ativos solúveis presentes em 1.000 g da droga vegetal, dissolvidos em 1.000 ml de extrato fluido hidroetanólico).

Uma alíquota, equivalente a 500 g, do extrato fluído obtido foi evaporado para fins de redução do teor de etanol, sendo este processo iniciado em aparelho evaporador rotativo a 45°C, em vácuo, e concluído em banho-maria. A evaporação foi conduzida, em temperatura de 45°C, até uma redução de 75% da massa inicial do extrato, o que consiste na obtenção de uma massa de extrato hidroetanólico evaporado equivalente a 125 g. Este extrato hidroetanólico evaporado das folhas de *Symphytum officinale* foi identificado como “EHESo” (Figura 4).

Foi preparada uma dispersão contendo 500 mg.ml<sup>-1</sup> de EHESo em solução aquosa de Tween 80 (monoleato de sorbitanopolioxietileno) a 12,0%. Esta dispersão foi utilizada para administração oral aos animais.

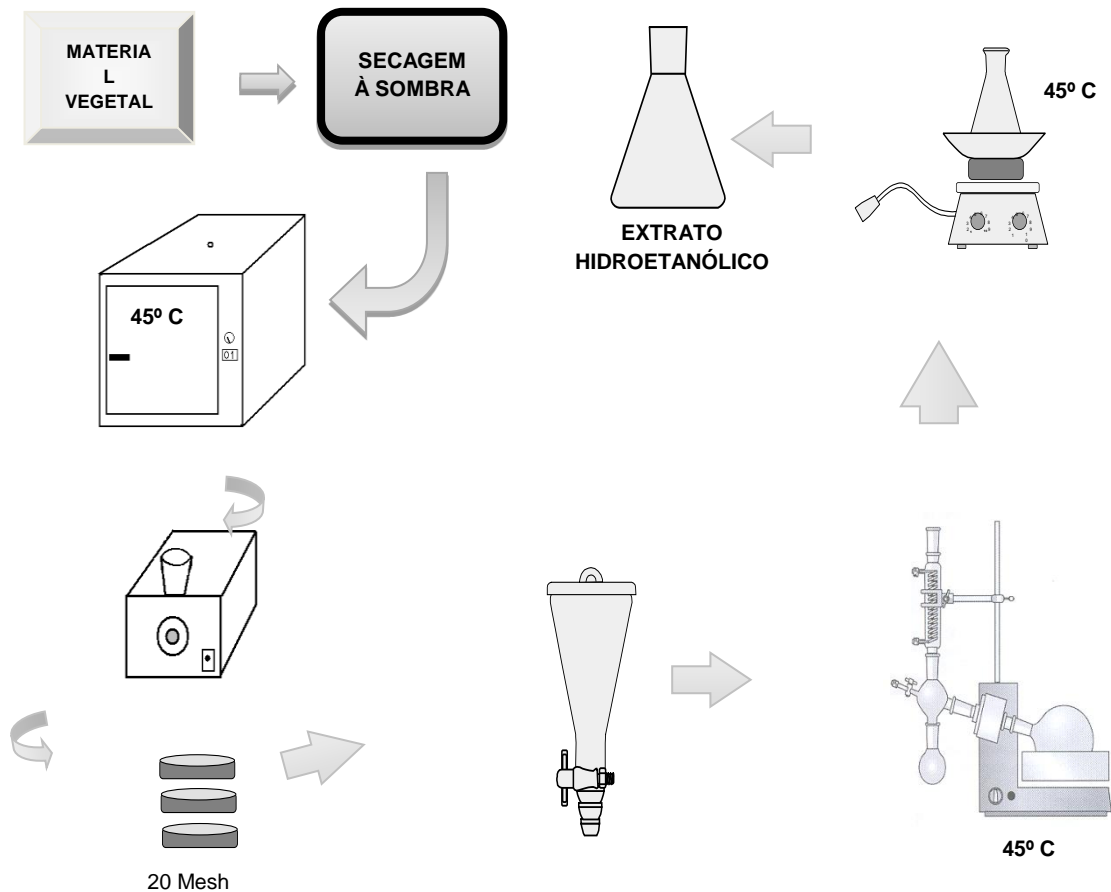


Figura 4- Esquema demonstrativo do processo de produção da droga vegetal e do extrato hidroetanólico. Esquema cedido pelo Professor Lincoln Cardoso.

Os procedimentos acima descritos para preparo da droga vegetal e da amostra para administração aos animais foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Pindamonhangaba – FAPI pelo Professor Lincoln Cardoso.

### **Eutanásia e coleta da tíbia para exame**

Para a eutanásia os animais foram submetidos à anestesia geral profunda seguida de sangria. As tíbias foram retiradas, imediatamente fixadas em formol a

10% e foram encaminhadas para os procedimentos específicos para as análises propostas na FOSJC - ICT - UNESP.

### **Preparo do material para análise histológica**

Depois de fixadas as tíbias foram descalcificadas em solução de EDTA 10%. Após descalcificadas as tíbias foram encaminhadas para o laboratório de patologia da FOSJC - ICT – UNESP onde a técnica responsável incluiu em parafina, fez cortes histológicos seriados de 5-6  $\mu\text{m}$ , passando pela região do defeito ósseo, e corou por HE e Tricrômico de Malory.

Os cortes histológicos foram fotografados com microscópio de luz Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss do Brasil) acoplado a câmera digital Canon, modelo Power Shot A640. Foram obtidas três imagens digitais (formato JPEG) em aumento de 25X, respectivamente de 03 cortes histológicos para cada animal, da região central do defeito, que foram usadas para análise histológica descritiva da reparação óssea.

## Resultados

### Análise histológica descritiva do período de 7 dias

Aos sete dias de reparação do defeito na tíbia todos os grupos apresentaram as características da fase inicial do processo de reparação óssea. O tecido de reparação formava calo ósseo evidente, constituído por tecido de granulação e osso primário. O tecido de reparação preencheu principalmente a área da lesão óssea e o canal medular adjacente, exibindo menor quantidade em localização periosteal adjacente as bordas do defeito. Observaram-se resquícios de coágulo sanguíneo, áreas fibrinosas e tecido de granulação em quantidades variáveis, localizados principalmente na porção superior e central do tecido de reparação e na área correspondente ao centro da lesão óssea. O tecido de granulação apresentava numerosos fibroblastos volumosos em meio a numerosas hemácias. No canal medular e na região periosteal o tecido ósseo primário formado mostrava grande quantidade de osso primário, caracterizado por trabéculas imaturas entremeadas por tecido conjuntivo frouxo bem vascularizado e com extravasamento de hemácias. As trabéculas neoformadas se originavam do perióstio, do endóstio e de células mesenquimais. Estas eram delgadas, bastante interconectadas, com numerosas lacunas contendo osteócitos e hemácias e com pouca matriz colagenosa ficando por isso com aspecto poroso. Em alguns animais observou-se tecido osteocondral em pequena quantidade, nas bordas da lesão óssea, misturado ao tecido ósseo neoformado no perióstio.

Tais características embora semelhantes, devido ao fato de todos os grupos estarem na fase inicial do processo de reparação óssea, apresentaram pequenas

diferenças entre os grupos, como pode ser evidenciado no Quadro 1, nas Figuras 5, 6 e 7 e nos comentários nos parágrafos que se seguem.

No grupo controle sete dias (C7) observou-se calo ósseo preenchendo completamente o canal medular em todos os animais, com osso primário trabeculado, pequena quantidade de coágulo sanguíneo e de inflamação, espessa camada de tecido de granulação na superfície e reação periosteal de pequena ou média intensidade formando trabéculas ósseas. Houve formação de tecido osteocondral em metade dos animais. No rato 5 não foi possível localizar o defeito nos cortes histológicos realizados, por isso o mesmo foi desconsiderado ficando o grupo com n=5.

No grupo tratado com confrei fitoterápico aos 7 dias (F7) o calo ósseo preencheu totalmente o canal medular em 2 ratos, 2/3 do canal medular em 3 ratos e 1/3 do canal medular em 1 rato. A camada de tecido de granulação na superfície foi mais delgada que nos grupos controle e homeopático. A quantidade de reação periosteal com formação de osso trabecular foi maior que no grupo controle. Houve mais formação de tecido osteocondral que nos grupos controle e homeopático.

No grupo tratado com confrei homeopático aos sete dias (H7) observou-se calo ósseo com área menor que nos grupos controle e fitoterápico. Este preencheu completamente o canal medular em apenas 1 rato, enquanto nos outros 5 ratos preencheu cerca de 2/3 do canal medular. A reação periosteal foi mais intensa que no grupo controle e comparável ao fitoterápico. A camada de tecido de granulação na superfície do calo era mais espessa que no grupo fitoterápico e comparável ao grupo controle. Houve formação de tecido osteocondral em apenas 1 rato.

Quadro 1: Características histológicas presentes na reparação da lesão óssea aos 7 dias nos grupos experimentais Controle (C), Fitoterápico (F) e Homeopático (H).

Grupo experimental - n <sup>o</sup> do rato	Área do canal medular com calo ósseo	Osso formado no perióstio	Osso formado na cavidade medular	Coágulo sanguíneo e inflamação	Tecido osteocondral	Tecido de granulação
C7 – r1	+++	++	+++	++	∅	++
C7 – r2	+++	+	+++	+	∅	+
C7 – r3	+++	+++	+++	+	+	+++
C7 – r4	+++	+	+++	++	+	+++
C7 – r5	XX	XX	XX	XX	XX	XX
C7 – r6	+++	++	+++	+	+	++
F7 – r1	+++	+++	+++	+	+	+
F7 – r2	++	++	++	+	+	+
F7 – r3	++	+++	++	+	+	+
F7 – r4	++	++	++	∅	+	+
F7 – r5	+++	+++	+++	+	++	++
F7 – r6	+	++	+	+	+	+
H7 – r1	++	+	++	+	∅	+
H7 – r2	++	+++	++	+	∅	++
H7 – r3	++	+++	++	+	∅	++
H7 – r4	+++	++	++	+++	∅	+++
H7 – r5	++	++	++	++	∅	++
H7 – r6	++	++	++	+	+	++

Área total do canal medular preenchida pelo calo ósseo: +=1/3, ++=2/3, +++=3/3

Quantidade de área preenchida por: osso formado na superfície periosteal, osso formado na cavidade medular, coágulo sanguíneo e inflamação, tecido osteocondral, tecido de granulação:

∅=ausente, +=pouco, ++=médio, +++=muito,

XX: animal excluído.

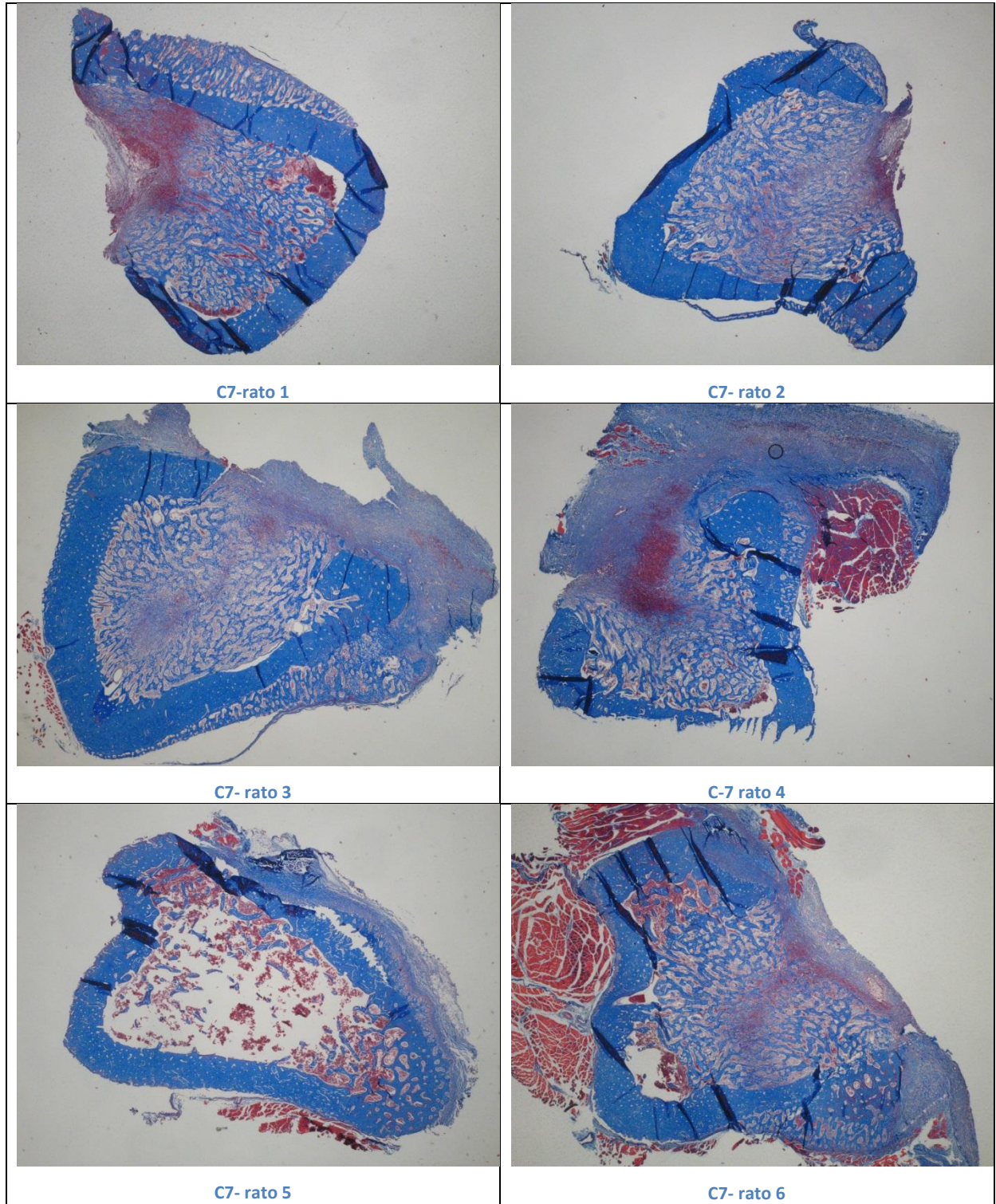


Figura 5- Grupo Controle 7 dias. Aspecto microscópico da reparação óssea. Microfotografias em aumento de 25X. Coloração Tricrômio de Mallory.

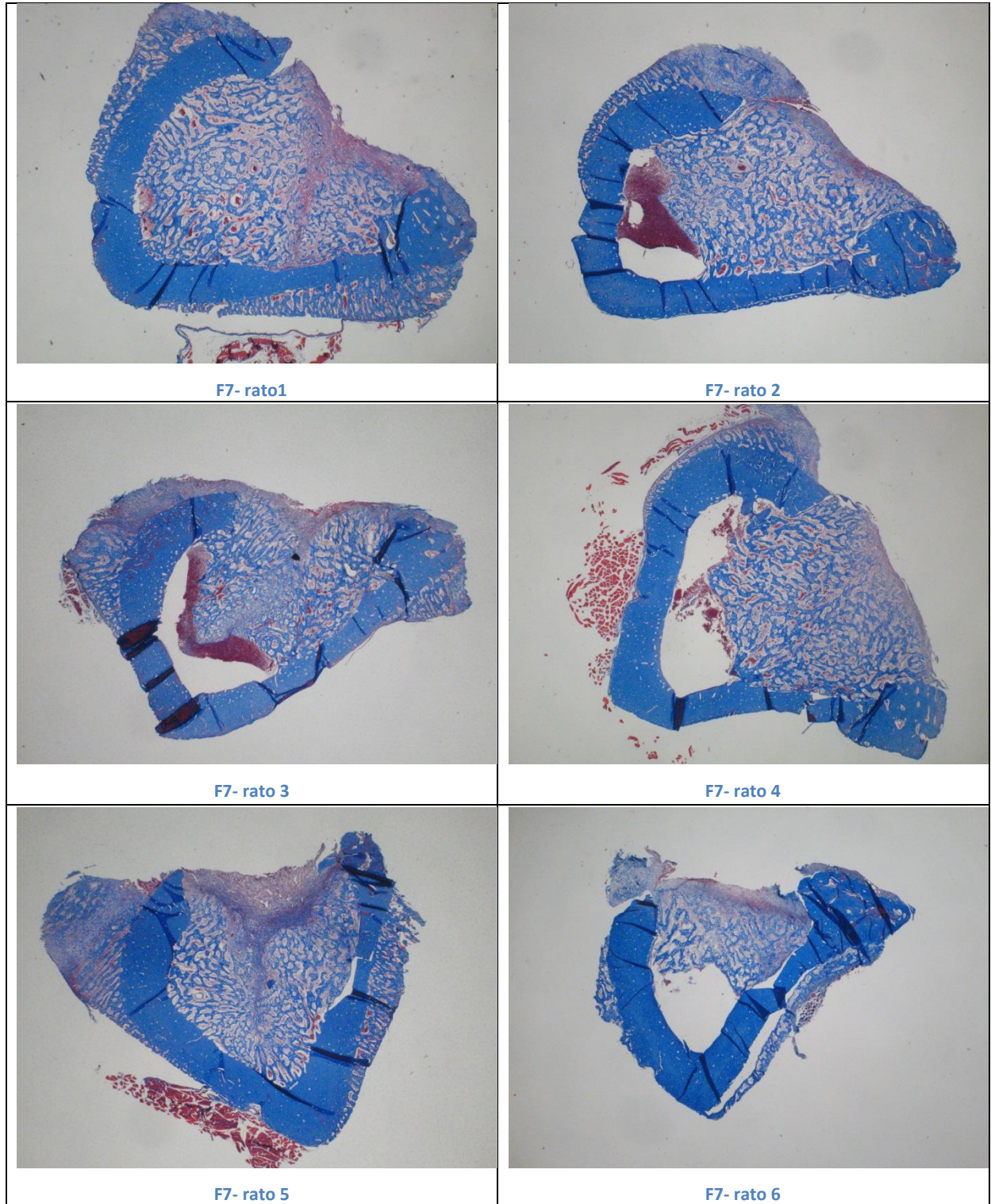


Figura 6- Grupo Fitoterapia 7 dias. Aspecto microscópico da reparação óssea. Microfotografias em aumento de 25X. Coloração Tricrômio de Mallory.



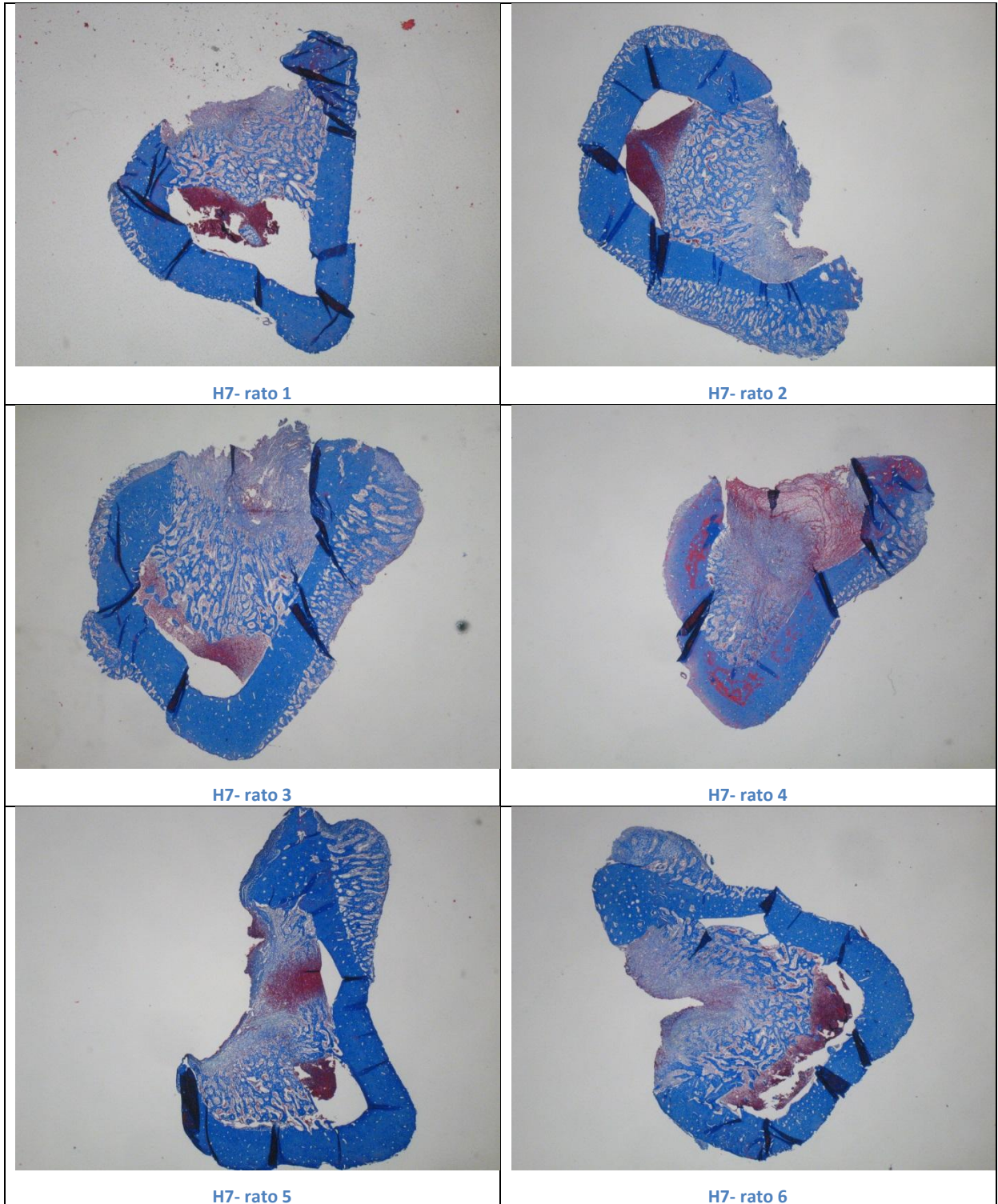


Figura 7- Grupo Homeopatia 7 dias. Aspecto microscópico da reparação óssea. Microfotografias em aumento de 25X. Coloração Tricrômio de Mallory.

## **Análise histológica descritiva do período de 14 dias**

Aos 14 dias foi possível observar a evolução da maturação do calo ósseo em todos os grupos. A área do calo diminuiu nos grupos C e F e aumentou no grupo H. O aspecto de fase inflamatória diminuiu enquanto a formação de osso novo ficou mais evidente. As trabéculas de osso primário ficaram mais largas, com maior quantidade de matriz colágena e apresentaram osteócitos bem evidentes. Trabéculas de aspecto poroso contendo hemácias diminuíram intensamente. As trabéculas se concentravam principalmente no terço superior do canal medular, já esboçando orientação para formar uma ponte óssea entre as bordas do defeito. Havia formação de osso trabecular periosteal menor, mas presente em alguns ratos, em todos os grupos. O tecido de granulação diminuiu de quantidade em todos os grupos. O tecido osteocondral diminuiu nos grupos controle e fitoterápico e aumentou no homeopático. Já se observava tecido hematopoiético ocupando o canal medular em todos os grupos. As diferenças entre os grupos podem ser verificadas no Quadro 2, nas Figuras 8, 9 e 10 e nos comentários abaixo.

No grupo C14 dias (C14), comparado ao C7, observou-se diminuição da área do calo ósseo, da reação periosteal, da formação de tecido osteocondral e da quantidade de tecido de granulação superficial. Já se evidenciava início de formação de ponte óssea unindo as bordas da lesão. No rato 5 do grupo C14 dias não foi possível localizar o defeito nos cortes histológicos realizados, por isso o mesmo foi desconsiderado ficando o grupo com n=5.

No grupo F14 dias (F14), comparado ao F7, notou-se diminuição da área do calo ósseo e início de formação de ponte óssea unindo as bordas da lesão. A camada de tecido de granulação superficial diminuiu sua espessura. A formação óssea periosteal e de tecido osteocondral foi menor.

No grupo H 14 dias (H14), comparado ao H7, notou-se aumento da área do calo ósseo e aumento da celularidade e da quantidade de osteoblastos. O calo ósseo preenchia quase todo o canal medular em metade dos animais e 2/3 do canal na outra metade. Destacava-se a formação de osso trabecular originado a partir do endóstio, formando uma camada que contornava a face interna do canal medular, principalmente no fundo do canal medular. Observaram-se trabéculas largas, bastante conectadas e celularizadas, com muitos osteoblastos ao seu redor. Havia início de formação de ponte óssea unindo as bordas da lesão em todos os animais. O rato 2 do grupo H14 ainda apresentava uma pequena área com trabéculas mais porosas misturadas a resíduo de coágulo sanguíneo.

As diferenças entre os grupos F14 e C14 não foram muito acentuadas. Em média houve semelhança entre a área do calo ósseo, a quantidade de tecido osteocondral e a quantidade de neoformação de trabéculas ósseas. No entanto, o espaçamento entre as trabéculas ósseas foi maior em F14.

Porém, comparando-se C14 e F14 com H14 notava-se que a maturação do calo ósseo estava menos avançada no grupo H14. A área do calo ósseo era maior no grupo H. A porção do calo ósseo dentro do canal medular era maior no grupo H. O esboço de formação de ponte óssea unindo as bordas do defeito era menos evidente no grupo H. A proliferação de osso endosteal era maior no grupo H (Quadro 2 e Figuras 8, 9 e 10).

Quadro 2: Características histológicas presentes na reparação da lesão óssea aos 14 dias, nos grupos experimentais controle (C), fitoterápico (F) e homeopático (H).

Grupo experimental - n <sup>o</sup> do rato	Área do canal medular com calo ósseo	Osso formado no periosteio	Tecido osteocondral	Tecido de granulação	Espaço entre trabéculas na medula	Espaço entre trabéculas na ponte
C14 – r1	+++	+	∅	∅	+++	++
C14 – r2	++	+	∅	+	++	+
C14 – r3	++	++	+	++	++	+
C14 – r4	++	+	∅	+	++	+
C14 – r5	XX	XX	XX	XX	XX	XX
C14 – r6	+	+	∅	∅	+++	+
F14 – r1	++	++	+	+	+++	++
F14 – r2	++	+	∅	+	+++	++
F14 – r3	+	∅	∅	+	+++	++
F14 – r4	++	+	+	+	+++	++
F14 – r5	++	∅	∅	+	+++	++
F14 – r6	++	+	∅	+	+++	++
H14 – r1	+++	+	∅	+	+	+
H14 – r2	+++	+	∅	+	+	+
H14 – r3	++	+	+	+	+	+
H14 – r4	+++	++	++	+	+	+
H14 – r5	++	∅	∅	+	++	+
H14 – r6	++	++	++	++	++	++

Área total do canal medular preenchida pelo calo ósseo: +=1/3, ++=2/3, +++=3/3

Quantidade de área preenchida por: osso formado na superfície periosteal, tecido osteocondral, tecido de granulação, espaço entre trabéculas medulares e espaço entre trabéculas na ponte óssea:

∅=ausente, +=pouco, ++=médio, +++=muito,

XX: animal excluído.

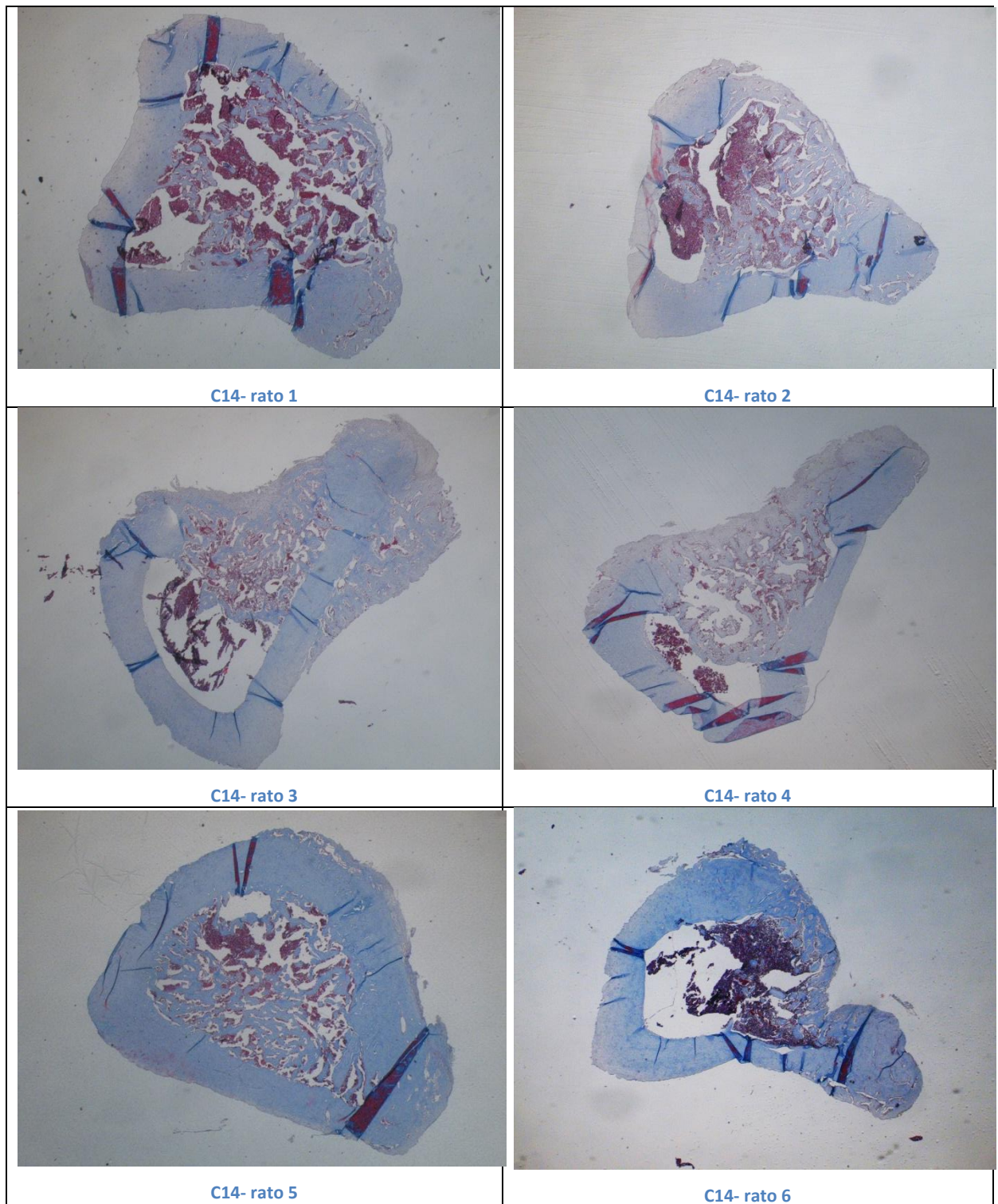


Figura 8- Grupo Controle 14 dias. Aspecto microscópico da regeneração óssea. Microfotografias em aumento de 25X. Coloração Tricrômio de Mallory.

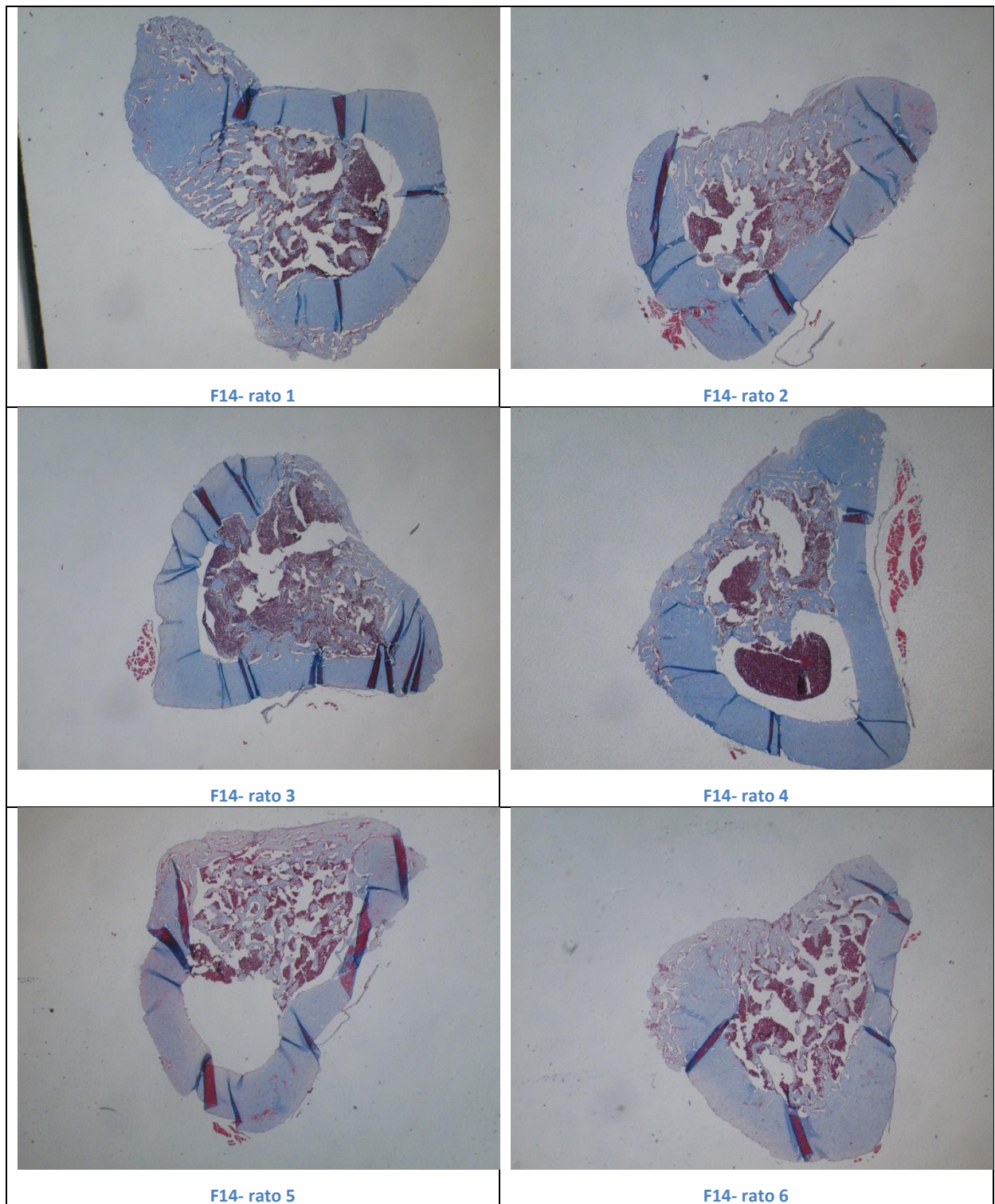


Figura 9- Grupo Fitoterapia 14 dias. Aspecto microscópico da regeneração óssea. Microfotografias em aumento de 25X. Coloração Tricrômio de Mallory.

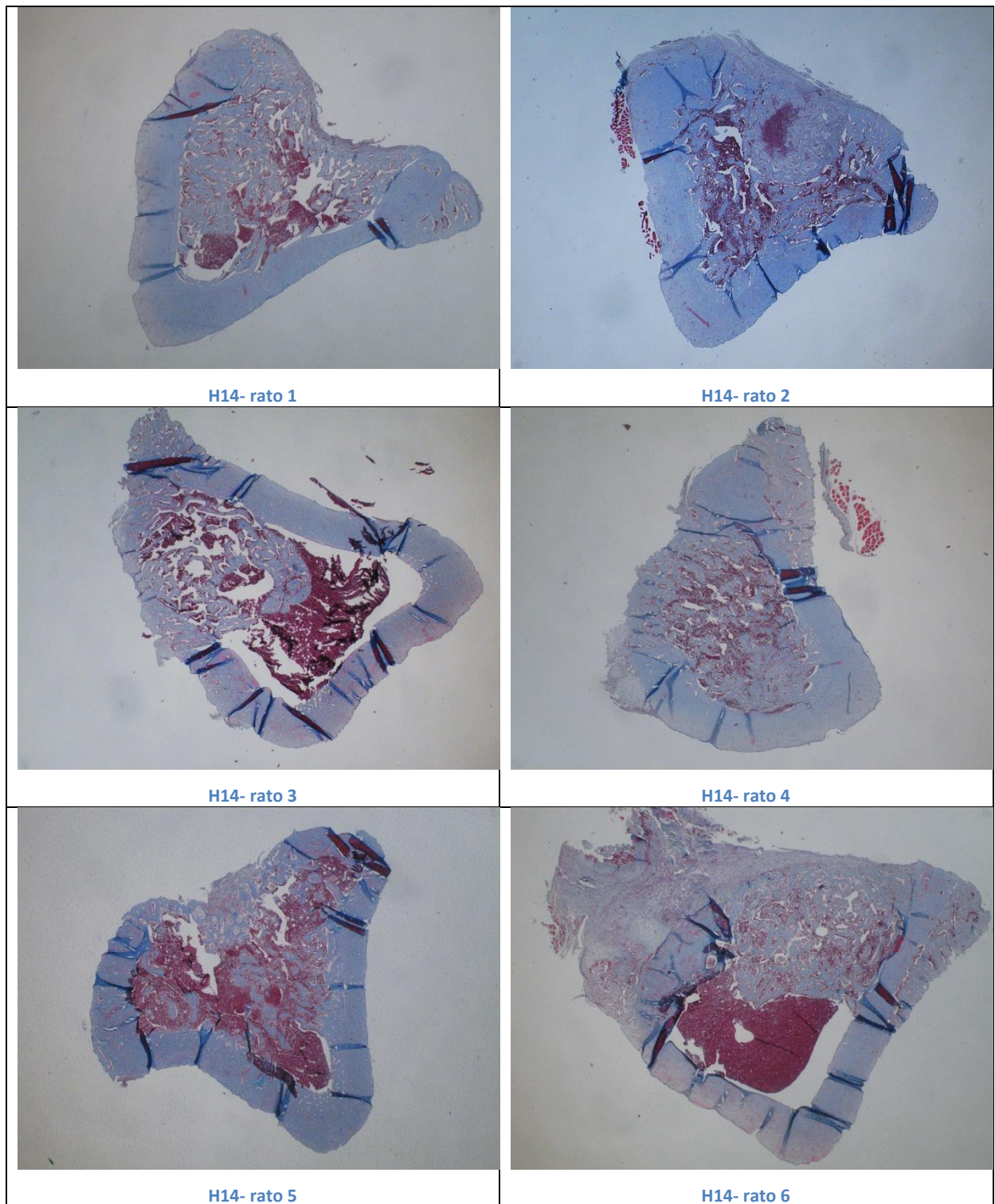


Figura 10- Grupo Homeopatia 14 dias. Aspecto microscópico da regeneração óssea. Microfotografias em aumento de 25X. Coloração Tricrômio de Mallory.

## **Análise histológica descritiva do período de 21 dias**

Aos 21 dias o calo ósseo estava em uma fase mais avançada do processo de reparação. Não foi mais encontrado tecido osteocondral ou tecido de granulação. A formação óssea no perióstio diminuiu sensivelmente. A área do calo ósseo preenchendo o canal medular também diminuiu em todos os grupos, com liberação do espaço para a medula óssea. Todos os grupos apresentavam uma ponte óssea unindo as bordas do defeito, com alguns pontos de fusão com a cortical remanescente. A ponte óssea era geralmente mais delgada que a cortical original. A ponte era constituída principalmente por osso trabecular. As trabéculas eram mais largas e menos espaçadas que aos 14 dias. Em vários animais as trabéculas da ponte estavam entremeadas com poucas áreas de osso compacto, sinais de remodelação parcial. As diferenças entre os grupos podem ser evidenciadas no Quadro 3 e nas Figuras 11, 12 e 13.

Comparando C14 e C21 foi observado diminuição da área do calo e diminuição do osso periosteal. A ponte óssea formada era estreita, constituída basicamente por osso trabecular, as trabéculas eram mais largas que aos 14 dias e com menor espaçamento entre si. Áreas de osso compacto remodelado eram encontradas nas extremidades da ponte.

Comparando F14 e F 21 foi observada intensa diminuição da área do calo no canal medular. Este estava localizado principalmente na região da lesão cortical, formando uma ponte óssea. Esta era formada principalmente por osso trabecular, porém 4 ratos já tinham pequenas áreas de osso compacto. O espaço entre as trabéculas diminuiu.



Comparando H14 e H 21, diminuiu bastante a área do calo no canal da medula e a formação de osso periosteal. As pontes ósseas eram bem organizadas e evidentes.

Não foram evidenciadas muitas diferenças histológicas entre os 3 grupos aos 21 dias. No entanto, a largura da ponte óssea foi maior nos grupos tratados com confrei que no controle. Observou-se maior remodelação do osso neoformado no grupo H21, pois a quantidade de trabéculas ósseas no canal medular foi menor neste grupo.

Quadro 3: Características histológicas presentes na reparação da lesão óssea aos 21 dias, nos grupos experimentais controle (C), fitoterápico (F) e homeopático (H).

Grupo experimental n <sup>o</sup> do rato	Área do canal medular com calo ósseo	Osso formado no periósteeo	Largura ponte óssea	Espaço entre trabéculas na ponte	Osso trabecular na ponte	Osso compacto na ponte
C21 – r1	++	∅	+	+	+	+
C21 – r2	+	+	++	+	+	+
C21 – r3	++	∅	++	++	++	∅
C21 – r4	+	∅	+	++	++	∅
C21 – r5	+	++	+	+	+	∅
C21 – r6	++	∅	+	+	+	+
F21 – r1	+	+	+++	+	++	+
F21 – r2	++	∅	+	+	+	+
F21 – r3	+	∅	++	+	+	+
F21 – r4	+	+	++	+	++	∅
F21 – r5	∅	∅	+	+	+	+
F21 – r6	∅	∅	+++	+	+++	∅
H21 – r1	+	+	++	+	+	+
H21 – r2	XX	XX	XX	XX	XX	XX
H21 – r3	+	+	++	+	++	∅
H21 – r4	∅	+	++	+	+	++
H21 – r5	+	∅	++	+	++	+
H21 – r6	∅	+	++	+	++	∅

Área total do canal medular preenchida pelo calo ósseo: ∅=ausente, +=1/3, +=2/3, +++=3/3.

Quantidade de área preenchida por: osso formado na superfície periosteal, espaçamento entre trabéculas na ponte óssea, osso trabecular na ponte óssea e osso compacto na ponte óssea.

∅=ausente, +=pouca, +=médica, +++=muita.

Largura da ponte óssea/largura da cortical óssea: +=1/3, +=2/3, +++=3/3..

XX: animal excluído do grupo.

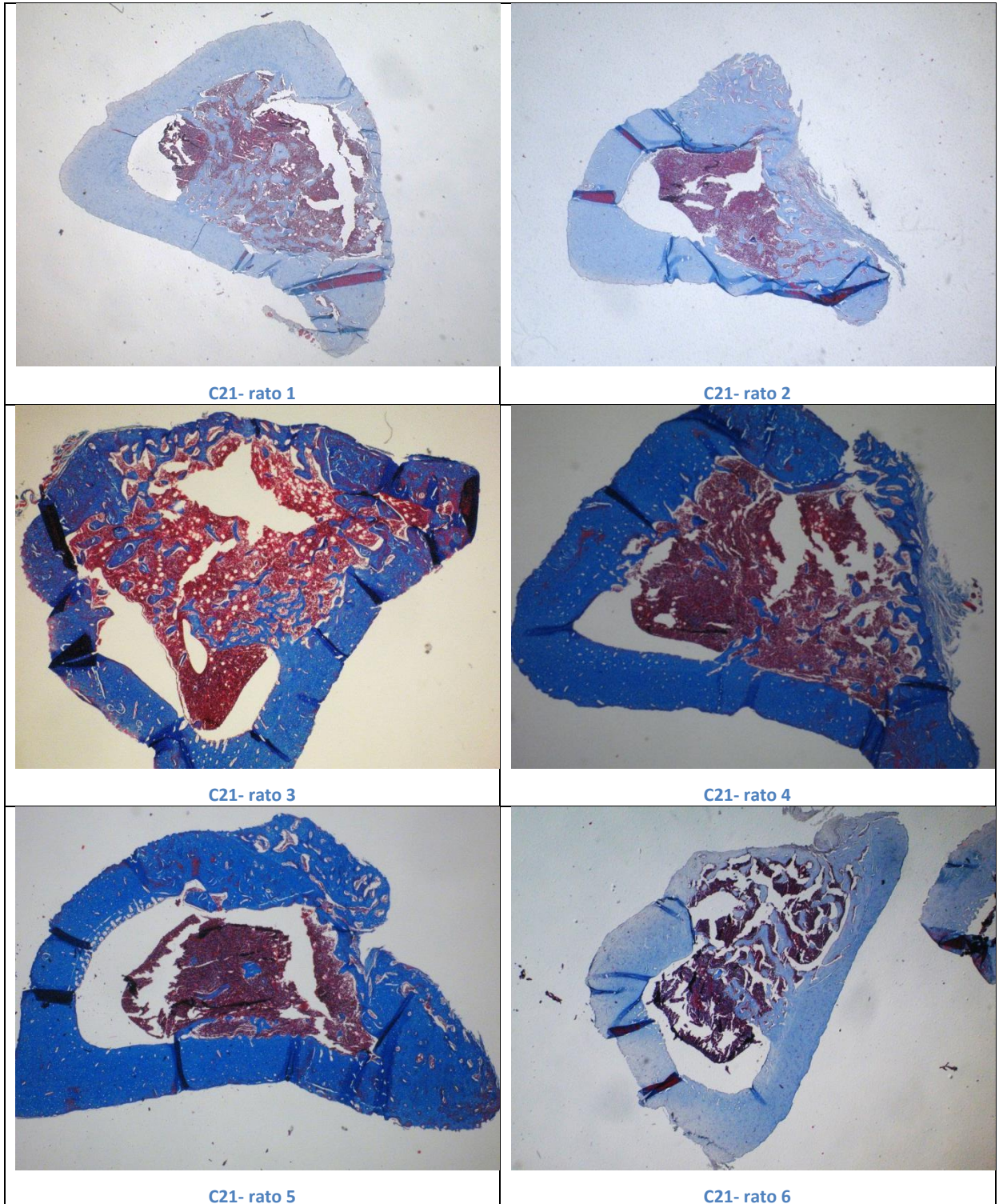


Figura 11- Grupo Controle 21 dias. Aspecto microscópico da regeneração óssea. Microfotografias em aumento de 25X. Coloração Tricrômio de Mallory.

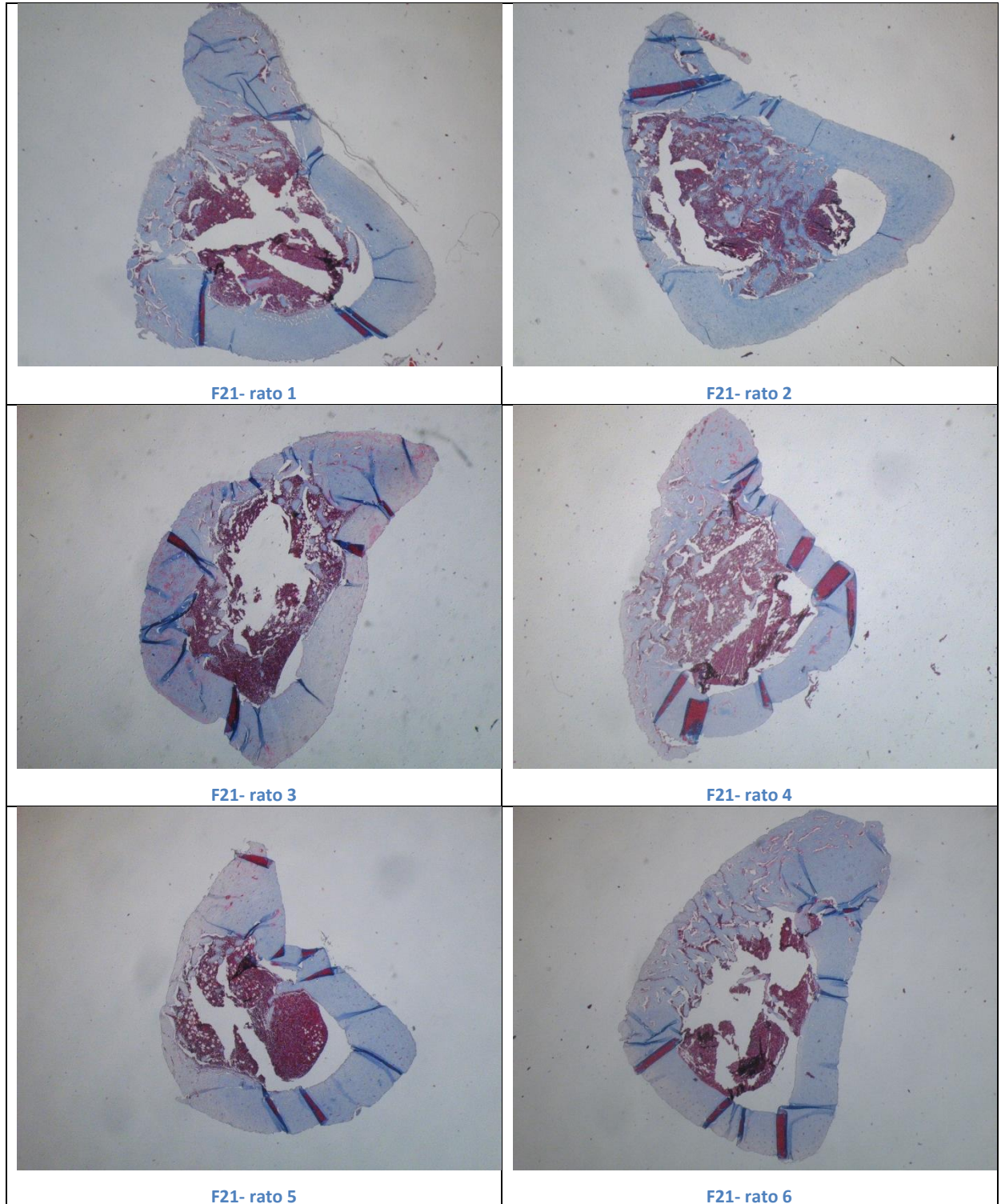


Figura 12- Grupo Fitoterapia 21 dias. Aspecto microscópico da regeneração óssea. Microfotografias em aumento de 25X. Coloração Tricrômio de Mallory.

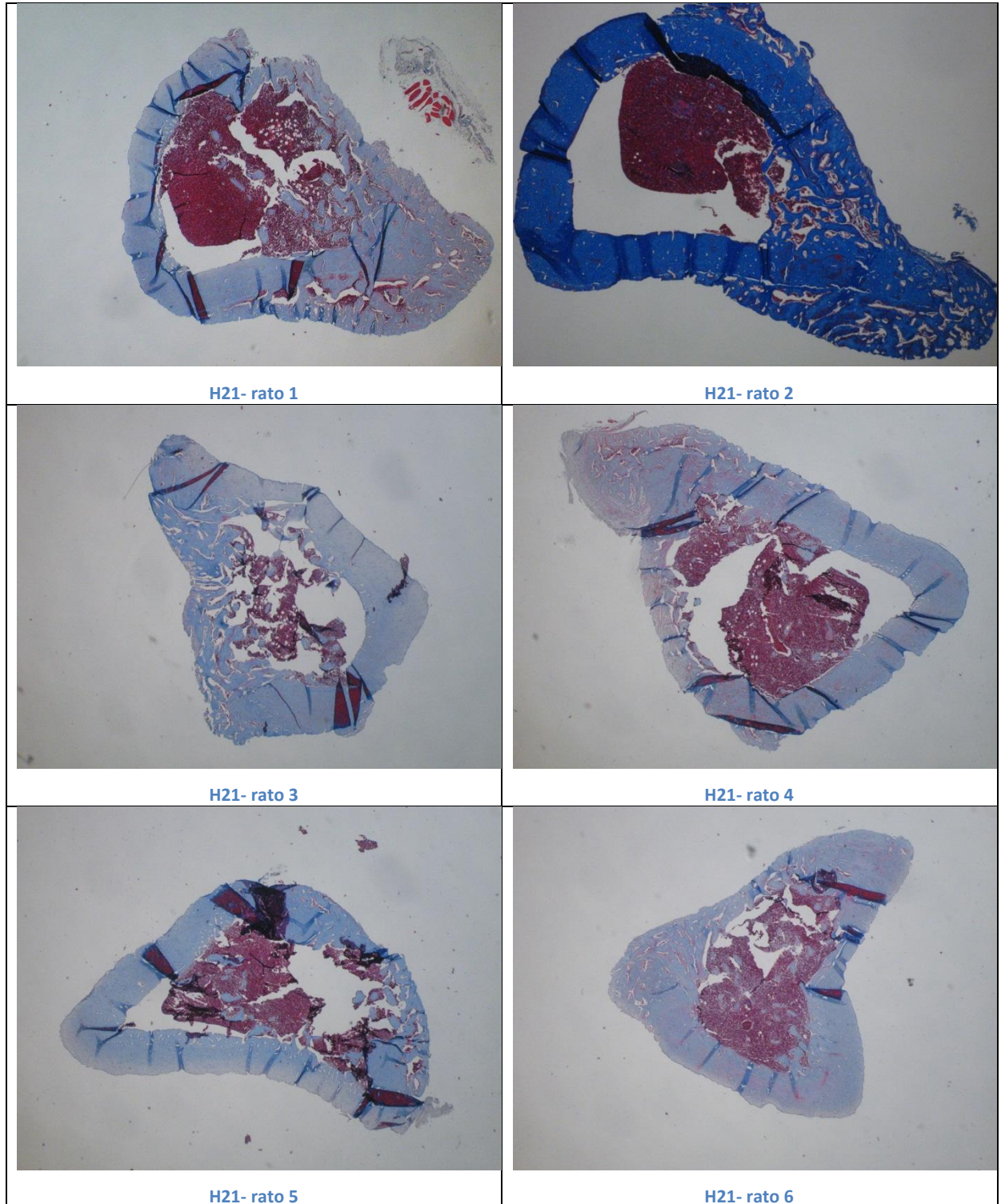


Figura 13- Grupo Homeopatia 21 dias. Aspecto microscópico da regeneração óssea. Microfotografias em aumento de 25X. Coloração Tricrômio de Mallory.

## **Análise histológica descritiva do período de 30 dias**

No período de 30 dias a ponte óssea unindo as bordas do defeito mostrou remodelação mais avançada que aos 21 dias. No entanto, em nenhum dos grupos a ponte óssea atingiu a largura do osso cortical original nem completou a remodelação para osso compacto. Nas extremidades da ponte havia mais osso compacto e na porção central mais osso trabecular. A fusão do osso novo com a cortical estava mais acentuada, por vezes tornando difícil evidenciar o limite entre a ponte óssea e a cortical original. Em todos os grupos ainda se evidenciava discreta proliferação óssea periosteal em alguns animais. Havia uma camada delgada de osso compacto superposta na superfície endosteal em todos os grupos. De um modo geral não houve muitas diferenças microscópicas entre os 3 grupos. Estas podem ser observadas no Quadro 4 e nas Figuras 14, 15 e 16.

Quadro 4: Características histológicas presentes na reparação da lesão óssea aos 30 dias, nos grupos experimentais controle (C), fitoterápico (F) e homeopático (H).

Grupo experimental n <sup>o</sup> do rato	Osso formado no perióstio	Largura ponte óssea	Espaço entre trabéculas na ponte	Osso trabecular na ponte	Osso compacto na ponte
C30 – r1	+	++	+	+	++
C30 – r2	+	++	+	++	+
C30 – r3	+	+++	+	+	++
C30 – r4	++	++	+	++	+
C30 – r5	+	++	+	++	+
C30 – r6	++	++	+	+	++
F30 – r1	+	++	+	+	++
F30 – r2	+	++	+	+	++
F30 – r3	+	+	+	++	+
F30 – r4	∅	++	+	+	++
F30 – r5	+	++	+	+	++
F30 – r6	∅	++	+	+	++
H30 – r1	∅	++	+	++	+
H30 – r2	+	++	+	+	++
H30 – r3	∅	++	+	+	++
H30 – r4	∅	++	+	+	++
H30 – r5	+	++	+	++	+
H30 – r6	+	++	+	++	+

Quantidade de área preenchida por: osso formado na superfície periosteal, espaçamento entre trabéculas na ponte óssea, osso trabecular na ponte óssea e osso compacto na ponte óssea.

∅=ausente, +=pouca, +=média, +++=muita.

Largura da ponte óssea/largura da cortical óssea: +=1/3, +=2/3, +++=3/3..

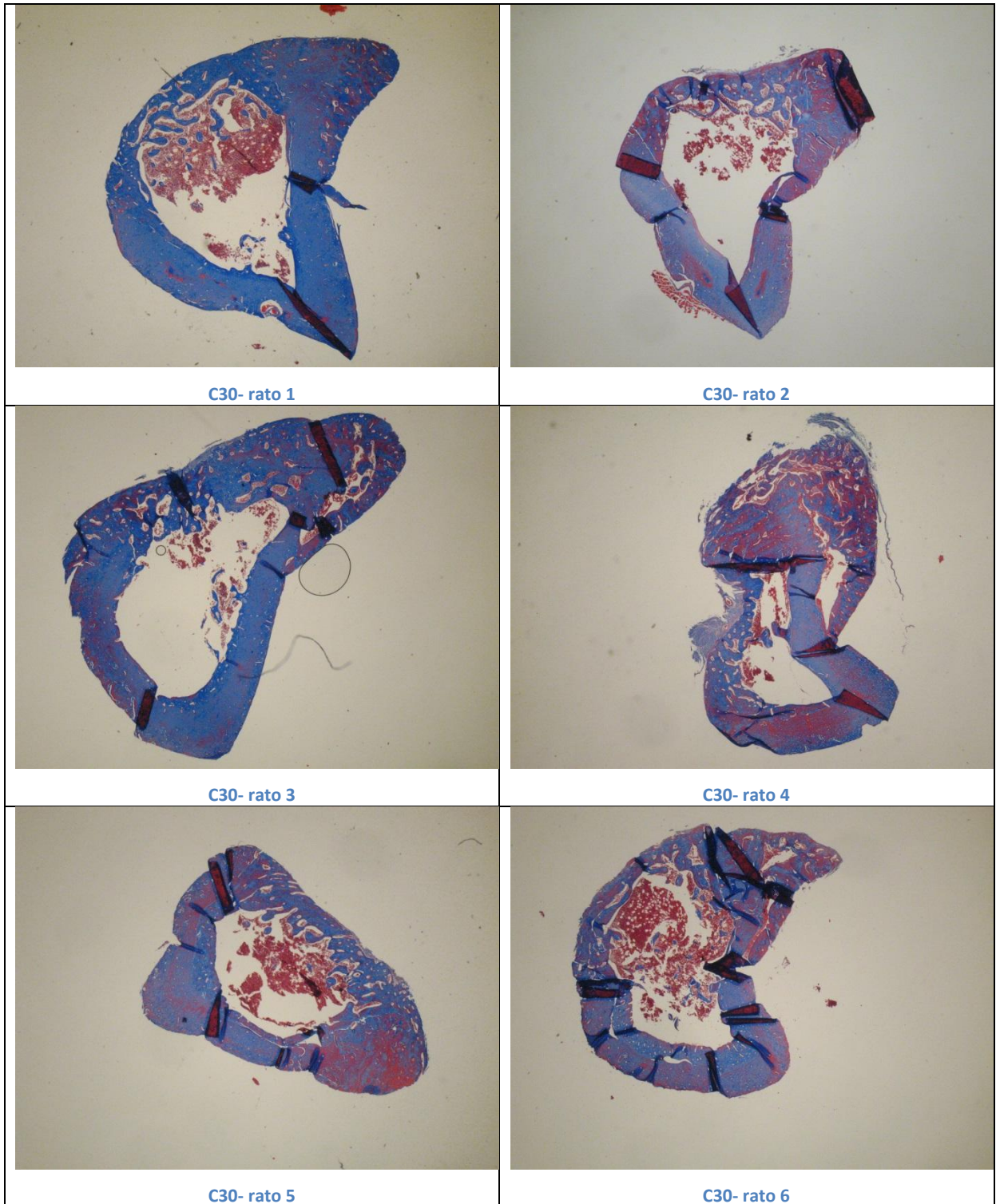


Figura 14- Grupo Controle 30 dias. Aspecto microscópico da regeneração óssea. Microfotografias em aumento de 25X. Coloração Tricrômico de Mallory.

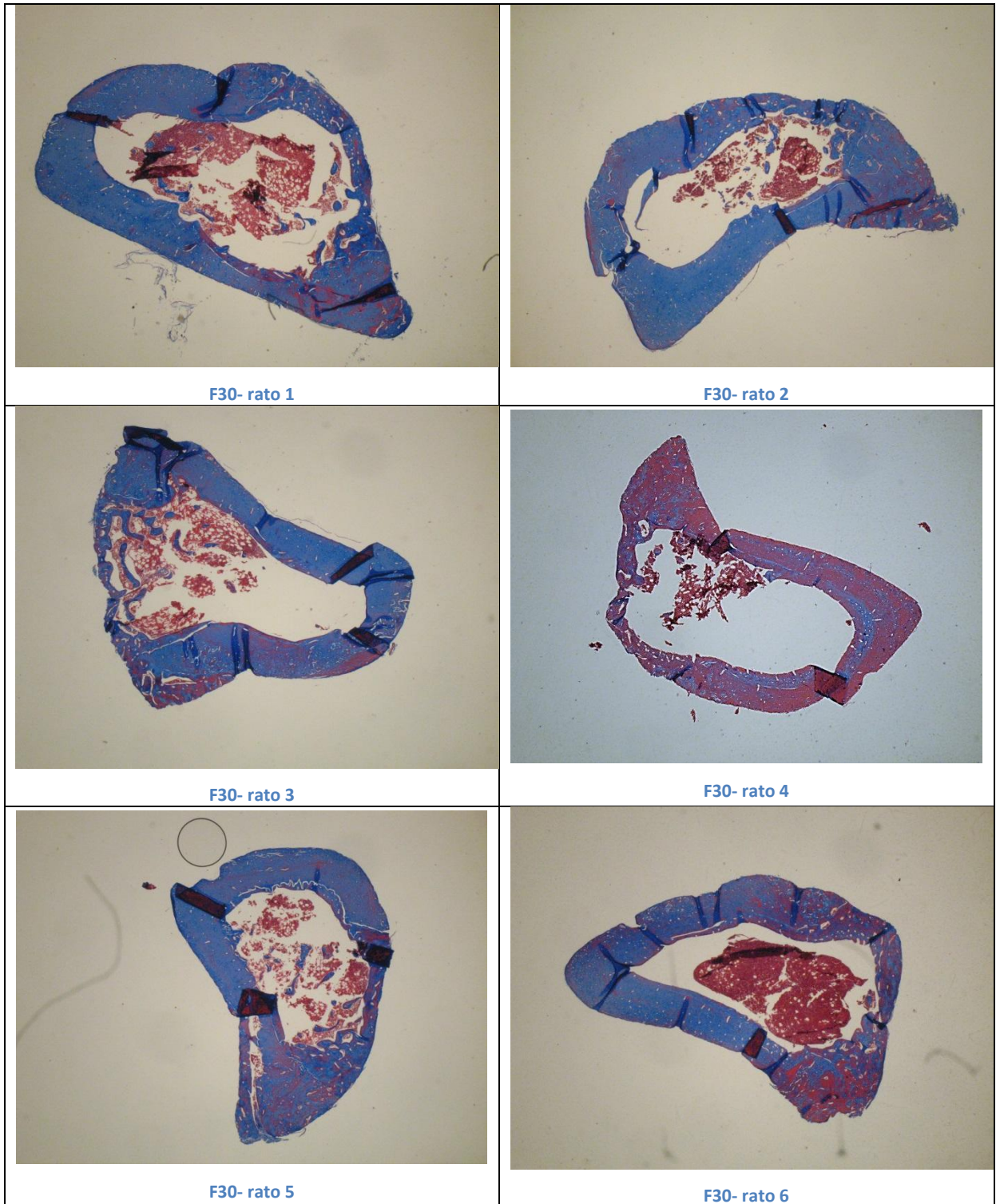


Figura 15- Grupo Fitoterapia 30 dias. Aspecto microscópico da regeneração óssea. Microfotografias em aumento de 25X. Coloração Tricrômico de Mallory.



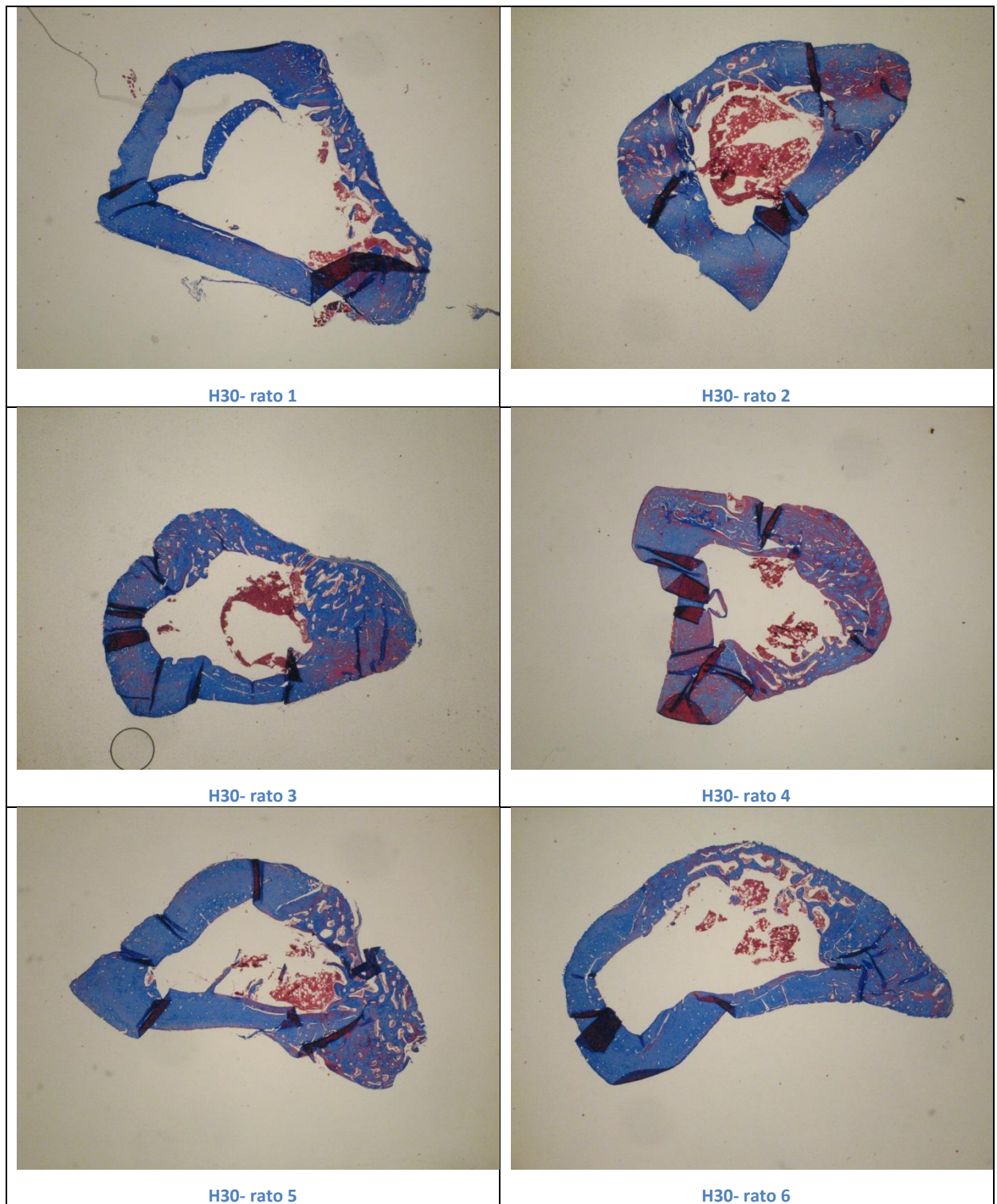


Figura 16- Grupo Homeopatia 30 dias. Aspecto microscópico da regeneração óssea. Microfotografias em aumento de 25X. Coloração Tricrômico de Mallory.

## Discussão

As fraturas ósseas representam um impacto significativo na saúde pública mundial. Tem sido observado um aumento na incidência e na prevalência de fraturas e o tratamento se tornou mais complexo e dispendioso. As fraturas podem ser associadas a causas internas como o envelhecimento da população, osteoporose, câncer, infecções. Também estão ligadas a causas externas como violência, acidentes traumáticos, intervenções cirúrgicas e outras.

Independente da causa, parte das fraturas é reparada sem muitas complicações. O seu tratamento geralmente implica em imobilização adequada, analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos. Mas, diversos fatores podem prejudicar a reparação óssea. Estima-se que 5 a 10% destas desenvolvam problemas e necessitem de intervenções médicas complexas, cirurgias e maior suporte medicamentoso (VICTORIA et al., 2009).

A intervenção medicamentosa na regeneração óssea representa ainda um grande desafio em procedimentos médicos e odontológicos.

Poucas são as pesquisas científicas sobre medicamentos alternativos, complementares e homeopáticos que atuem estimulando a regeneração óssea.

Em revisão da literatura constata-se que o conhecimento sobre reparo de fraturas e regeneração óssea evoluiu bastante. Nos últimos 20 anos as pesquisas nessa área expandiram, os artigos científicos se multiplicaram abordando novos tratamentos e intervenções. Foram desenvolvidas técnicas cirúrgicas diferentes, com ou sem fixação das extremidades com pinos e placas, associados ou não a medicamentos.

O conhecimento fisiológico funcional sobre reparação de fraturas avançou nas últimas décadas e é mais detalhado. O tecido ósseo é um dos poucos tecidos que pode se recuperar sem formação de cicatriz. O processo de reparação de fraturas recapitula fases do desenvolvimento ósseo e por isso pode ser considerado como uma forma de regeneração. Baseado nestes princípios observa-se regeneração óssea indireta ou direta.

O tipo mais comum de reparação de fraturas é a indireta, que pode ser por via osteocondral ou por via intramembranosa. Também pode haver associação das duas vias, todas resgatando mecanismos da formação do tecido ósseo. A osteocondral passa pela formação prévia de tecido cartilaginoso, que será posteriormente substituído por osso. Ocorre formação de quantidade variada de cartilagem, na dependência da presença de mobilidade, de estresse e carga no local, do tamanho e da complexidade da lesão, e das complicações associadas (GERSTENFELD et al, 2006; DIMITRIOU, 2005).

A reparação das fraturas ocorre em etapas ou fases superpostas em sequência (MARSELL e EINHORN, 2011).

A primeira é a fase inflamatória aguda. Nesta fase a lesão é preenchida por coágulo sanguíneo que se estabiliza, misturado a células da medula óssea. Vários mediadores químicos são liberados e se inicia uma inflamação localizada. Ocorre então a formação de tecido de granulação e estímulo à diferenciação e proliferação de células osteogênicas (RAHN, 2002).

Esta fase é uma resposta biológica importante e pode ser manipulada para melhorar a regeneração óssea (MOUNTZIARIS et al, 2011). A inflamação crônica é prejudicial ao reparo ósseo, no entanto a resposta inflamatória aguda que ocorre na primeira semana tem papel importante e envolve secreção de mediadores químicos

que estimulam angiogênese, diferenciação osteogênica de células mesenquimais, proliferação e atividade celular (GERSTENFELD et al, 2003, CHO et al, 2002, KERAMARIS et al, 2008, LEHMANN et al, 2005, SFEIR et al, 2005).

A segunda fase é a proliferativa, na qual as células osteogênicas já diferenciadas proliferam e ocupam a área lesionada formando o calo ósseo mole. Células condroides formam cartilagem que será posteriormente substituída por osso. Osteoblastos formam osso novo primário e sintetizam matriz óssea. Esta matriz vai se acumulando e circundando os futuros osteócitos. Enquanto isso, osteoclastos reabsorvem o osso danificado.

Células de diversas origens participam da regeneração óssea. As fontes mais significativas são: a superficial periosteal, a superficial endosteal e a mesenquimal a partir de células da medula óssea.

A terceira fase de maturação do calo ósseo envolve reabsorção primária e consolidação, constituindo o calo duro. Ocorrem reabsorção e calcificação do tecido cartilaginoso que é progressivamente vascularizado e substituído por osso primário. Continua sendo formado osso novo que apresenta arranjo em trabéculas com participação maior do periósteo.

A fase final é a de remodelação do calo ósseo. O osso trabeculado formado por osteoblastos ganha aspecto de osso lamelar e compacto e o excesso de osso formado no calo é reabsorvido por osteoclastos. Assim, o osso novo fica com a estrutura semelhante ao osso original, por isso pode se falar em regeneração. Embora a remodelação comece na terceira ou quarta semana de reparo, se completa somente em alguns meses (GERSTENFELD et al., 2005; GERSTENFELD et al., 2003, MARSELL e EINHORN, 2011).

Atualmente diversos modelos experimentais são utilizados para estudo da regeneração óssea. Eles favorecem diferentes vias de reparação, dependendo do tamanho e da complexidade da lesão, da quantidade de fragmentos, da presença de mobilidade. Outros fatores como infecção e necrose também podem interferir.

Em nosso estudo foi utilizado um defeito cortical produzido por perfuração com broca. Os defeitos ósseos monocorticais permitem a padronização de um tamanho específico e um formato regular. Além disso, garantem a estabilidade rígida dos tecidos no local do defeito. A maior parte da cortical ao redor da lesão permanece intacta e sem mobilidade. Também pode se controlar a presença de fragmentos na lesão e o tamanho e espaço entre eles. A mobilidade é um fator muito importante que interfere na formação do calo modificando seu tamanho, o tempo de reparo, a quantidade de cartilagem e outros aspectos.

O padrão de reparação em defeitos ósseos circulares de pequeno diâmetro, em torno de 2,5mm, é bem documentado e tem sido usado por vários pesquisadores (DRAENERT e DRAENERT, 1980; SHAPIRO, 2008).

O modelo experimental utilizado neste projeto privilegiou a regeneração por via intramembranosa, mas a participação da via endocondral eventualmente ocorreu em intensidade muito pequena. Trata-se de um defeito de tamanho pequeno, não crítico, que tem capacidade para se regenerar mesmo sem tratamento. Como somente uma pequena área da cortical foi lesionada não houve necessidade de fixar as extremidades e assim não houve interferência de mobilidade no processo de reparação, o que explica a pouca participação da via endocondral. Além desta vantagem este modelo experimental permitiu comparar defeitos de tamanho padronizado, eliminar a influência de reação a elementos estranhos como pinos e

placas e também padronizar o estímulo inflamatório que ficou semelhante entre os grupos e os animais.

A análise histológica se mostrou um método confiável e adequado para evidenciar e acompanhar as fases evolutivas da reparação de lesões ósseas, para demonstrar o efeito dos tratamentos e para verificar as diferenças entre eles.

Aos sete dias observamos a fase inflamatória da reparação. O calo se localizava principalmente na cavidade medular, provavelmente devido a predomínio de estímulo para as células mesenquimais e endosteais. A área total do calo e a quantidade de tecido de granulação foi menor nos 2 grupos tratados com *Symphytum* que no grupo controle (C). No entanto, avaliando outros aspectos da reparação que não o tamanho do mesmo, foi possível observar o efeito dos tratamentos. O *Symphytum* fitoterápico (F) estimulou maior reação periosteal e maior formação de tecido osteocondral que C e H. O *Symphytum* homeopático (H) formou maior reação periosteal que C. Comparando os 2 grupos tratados, o grupo H teve área de calo menor, muito pouco tecido osteocondral e mais tecido de granulação que F (Quadro 1, Figuras 5, 6 e 7). Consideramos estes dados como sinais positivos de estímulo do *Symphytum* na proliferação óssea periosteal, sendo o F melhor que o H, e também como sinal evidente de estímulo de F para a formação de tecido cartilaginoso.

Aos 14 dias o aspecto de fase inflamatória diminuiu enquanto a formação de osso novo ficou mais evidente. Houve uma inversão na resposta, a área total do calo diminuiu nos grupos C e F e aumentou no grupo H. Apesar do estímulo para formação de tecido cartilaginoso ter aumentado no grupo homeopático, ele foi em geral menor que no fitoterápico, considerando-se o total das 2 semanas de reparação. Comparando os 3 grupos verificou-se que a maturação do calo estava

menos avançada no H. Interpretamos este dado como representando que a ação do medicamento homeopático de estímulo ao reparo ósseo sobre as células mesenquimais e endosteais ocorreu alguns dias depois do fitoterápico (Quadro 2, Figuras 8, 9 e 10).

Aos 21 dias a ponte óssea fechando o defeito já estava presente em todos os grupos. O excesso de tecido formado no calo já tinha sido reabsorvido tanto na parte externa periosteal quanto no canal medular. A remodelação do calo ainda não estava completa, mas era evidente em todos os grupos. A largura das pontes ósseas foi discretamente maior nos 2 grupos tratados que no controle e em F foi discretamente maior que em H. Neste período novamente constatamos que, embora a diferença não tenha sido marcante, os tratamentos continuaram estimulando a reparação óssea. Considerando a remodelação do calo ósseo verificamos que esta foi maior em H que em F, uma vez que a intensidade de diminuição da área do calo de 14 dias para 21 dias foi maior em H que nos outros grupos. O possível retardo na resposta reparadora no grupo H observada de 7 para os 14 dias foi recuperada e a quantidade de osso lamelar aos 21 dias era equivalente nos grupos F e H (Quadro 3, Figuras 11, 12 e 13).

Aos 30 dias a remodelação não estava completa e não houve grandes diferenças entre os 3 grupos. Este período de tempo não foi suficiente para verificar qual tratamento estimularia a remodelação completa mais rapidamente. Seria necessário aguardar um tempo maior.

Apesar das observações neste estudo serem referentes apenas às fases iniciais da reparação foi possível verificar que o tratamento com *Symphytum officinale*, tanto fitoterápico quanto homeopático, interferiu no processo. Ambos formaram mais osso periosteal que o controle. O fitoterápico estimulou formação de

tecido osteocondral em maior quantidade e mais precocemente. O homeopático formou menos tecido osteocondral que o F, mas aos 14 dias superou o controle.

A formação óssea na superfície periosteal e a formação de tecido osteocondral são elementos importantes na reparação óssea, principalmente por via endocondral, quando há mobilidade das extremidades ósseas ou múltiplos fragmentos (SHAPIRO, 2008).

A ação do H sobre as células mesenquimais e endosteais demorou mais para ocorrer, no entanto a sua remodelação óssea foi mais rápida. A remodelação é uma etapa fundamental para a regeneração, isto é, para devolver ao tecido as características de se tornar igual ao tecido original, sem cicatriz. Será que esta melhor remodelação faz o *Symphytum* homeopático melhor que o fitoterápico? Será necessário estudar em um período mais longo para se completar a remodelação. Além disto, também será preciso testar a qualidade e a resistência do osso regenerado.

O que justifica ou explica essas pequenas diferenças? Qual tipo celular foi estimulado? Qual função celular foi estimulada? A análise histológica deveria responder essa questão. No entanto, este fato não ficou totalmente claro. Seria necessária uma análise mais detalhada, com identificação dos tipos celulares e de suas atividades.

O modelo de estudo usado não apresentou mobilidade das extremidades ósseas. Trata-se de um defeito monocortical pequeno, com estabilidade garantida, que privilegiou a reparação por via intramembranosa. Mesmo assim, um pouco de reparação por via endocondral também se desenvolveu. Houve predomínio de neoformação óssea a partir da medula, provavelmente originada de células



mesenquimais, e neste aspecto a diferença dos tratamentos para o controle não ficou clara.

Porém, os tratamentos mostraram maiores estímulos de proliferação óssea periosteal que o controle. Será que trabalhando com um modelo de fratura com separação das extremidades ósseas, com algum grau de mobilidade, que tivesse estimulado o reparo por via endocondral teria respondido de modo diferente aos tratamentos?

Será que trabalhando com lesões maiores a resposta teria sido diferente? Trabalhar com um defeito crítico, que não regenerasse espontaneamente, faria um confronto de controle interessante para verificar o estímulo dos tratamentos. O tamanho de 2,5 mm que utilizamos não representa um defeito crítico.

O controle com placebo que utilizamos na verdade foi mais direcionado para submeter os animais ao estresse de medicação semelhante, devido a manipulação da gavagem.

Existem varias vias através das quais uma lesão óssea pode se curar. Para alcançar uma regeneração completa do tecido ósseo muitos fatores anatômicos, fisiológicos, bioquímicos e biomecânicos estão inter-relacionados e devem ocorrer de modo harmonioso.

Acredito que quando a experimentação homeopática do *Symphytum officinale* foi realizada não foram feitas estas considerações. Os livros homeopáticos de matéria médica não relatam detalhes nesta direção.

Apesar do atual conhecimento sobre regeneração óssea, muitas questões ainda permanecem sem entendimento. São necessários mais estudos analisando a ação do *Symphytum officinale* na regeneração óssea.

Dentro das condições deste estudo podemos dizer que o *Symphytum officinale* na formulação homeopática, apesar da alta diluição, foi tão eficiente quanto o fitoterápico. A alta diluição usada na homeopatia não diminuiu o efeito da planta na regeneração óssea. Faz-se necessário avaliar o efeito em tempo maior de tratamento e em outros modelos experimentais ou no ser humano.

O efeito positivo do *Symphytum officinale* homeopático no reparo é importante. Não podemos esquecer a toxicidade do fitoterápico que levou inclusive a proibição de seu uso interno. Não há relatos de toxicidade da formulação homeopática e provavelmente na diluição utilizada não teremos esse tipo de problema.

A investigação do efeito deste medicamento na formulação homeopática na regeneração óssea será de grande utilidade, fato reforçado por ser este um medicamento alternativo de baixo custo, e de fácil acesso à população.

## Conclusões

Dentro das condições e limitações deste estudo foi possível concluir que nas fases iniciais do processo de reparação de lesões ósseas:

Os tratamentos com *Symphytum officinale* fitoterápico e homeopático estimularam a reparação óssea,

O medicamento homeopático *Symphytum officinale* 6CH apresentou formação de osso na cavidade medular alguns dias mais tardia que o fitoterápico,

O medicamento fitoterápico *Symphytum officinale* estimulou formação de tecido osteocondral e de tecido ósseo periosteal,

O medicamento homeopático *Symphytum officinale* 6CH estimulou a formação de tecido ósseo periosteal e apresentou remodelação óssea mais rapidamente,

São necessários mais estudos analisando os efeitos do *Symphytum officinale*.

## Referências

Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA [on line]. Resolução – RDC n. 48, de 16 de março de 2004. [acesso 20 ago 2011]. Disponível em:

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc\\_48\\_16\\_03\\_04\\_registro\\_fitoterapicos%20.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapicos%20.pdf)

Albuquerque UP, Andrade LHC. Fitoterapia: Uma alternativa para quem? Recife: Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. [s.d] [Acesso 20 ago 2011]. Disponível em: <http://www.etnobotanicaaplicada.com.br/pt/gerenciador/uploadfiles/de4150f7b77ca0c1e7a29032802ab8f5.pdf>.

Balducci-Roslindo E, Silvério KG, Malagoli DM. Processo de reparo em feridas de extração dentária em camundongos tratados com o complexo *Symphytum officinale* e *Calendula officinallis*. Rev Odontol Univ São Paulo. 1999; 13(2):181-7.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS). [on line]. Portaria n. 19, de 30 de janeiro de 1992. [acesso 2007 set 20]. Disponível em: [http://200.214.130.38/saudelegis/leg\\_norma\\_espelho\\_consulta.cfm?id=3232655&highlight=&bkp=pesqnorma&fonte=0&origem=156&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo\\_norma=27&numero=19&data=&dataFim=&ano=1992&pag=1](http://200.214.130.38/saudelegis/leg_norma_espelho_consulta.cfm?id=3232655&highlight=&bkp=pesqnorma&fonte=0&origem=156&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo_norma=27&numero=19&data=&dataFim=&ano=1992&pag=1).

Carvalho JCT. Fitoterápicos Antiinflamatórios (aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas). São Paulo: Tecmed; 2004.

Castro D. Noções elementares de farmacotécnica homeopática. São Paulo: Edição da revista similia; 1982

Chaves MGAM. Efeito do medicamento homeopático (*Symphytum officinallis* 6CH) e do osso bovino granulado na reparação óssea em tibia de ratos: estudo histomorfométrico [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2003.

Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. Journal of Bone & Mineral Research. 2002; 17(3):513–20. [PubMed: 11874242]

Cornillot, P. Tratado de Homeopatia. Porto Alegre: Artmed; 2005.

Corrêa AD, Siqueira-Batista R, Quintas LEM. *Similia Similibus Curentur*: notação histórica da medicina homeopática. Rev Assoc Med Bras. 1997 out/dez; 43(4):347-51.

Dimitriou R, Tsiroidis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. Injury. 2005; 36(12):1392–404. [PubMed: 16102764]

Draenert Y, Draenert K (1980) Gap healing of compact bone. Scan Elec Microsc 1980/IV: 103-111.

Federici E, Multari G, Gallo FR, Palazzino G. Le droghe vegetali: dall'uso tradizionale allanormativa. Ann Ist Super Sanità 2005; 41(1):49-54.

Figueiredo MR, Kaplan MAC. Pyrrolizidine alkaloids: A word of caution. J Braz Assoc Adv Sci. 1997 Sep-Dec; 49(5/6): 331-8.

Gayotto LCC, Alves VAF. Doenças do Fígado e Vias Biliares. São Paulo: Atheneu; 2001.

Gerstenfeld LC, Culliname DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects o its regulation. Journal of Cellular Biochemistry. 2003; 88(5):873–84. [PubMed: 12616527]

Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. Perspective application of histomorphometric methods to the study os bone repair. JBMR. 2005; 20(10):1715-22.

Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, et al. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2006; 54(11):1215–28. [PubMed:16864894]

Goldman RS, Freitas PCD, Oga S. Wound healing and analgesic effect of crude extracts of *Symphutum officinale* in Rats. Fitoterapia. 1985;56(6): 323-9.

Guo L, Mei N, Dial S, Fuscoe J, Chen T. [Comparison of gene expression profiles altered by comfrey and riddelliine in rat liver.](#) BMC Bioinformatics. 2007 Nov; 8 Suppl 7:S22.

Pustiglione, M. O Organon da arte de curar de Samuel Hahnemann para o Século XXI. São Paulo: Editora Organon, 2010.

Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, et al. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 2008; 39(Suppl 2):S45–57. [PubMed: 18804573]

Kossak-Romanach A. Homeopatia em 1000 conceitos. São Paulo: Editora Elcid; 2003.

Lehmann W, Edgar CM, Wang K, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone*. 2005; 36(2):300–10. [PubMed: 15780956]

Marsell, R and Einhorn, TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011 June; 42(6): 551–555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031

Mei N, Guo L, Fu PP, Heflich RH, Chen T. Mutagenicity of comfrey (*Symphytum Officinale*) in rat liver. *Br J Cancer*. 2005 Mar 14;92(5):873-5.

Mei N, Guo L, Zhang L, Shi L, Sun YA, Fung C, et al. [Analysis of gene expression changes in relation to toxicity and tumorigenesis in the livers of Big Blue transgenic rats fed comfrey \(\*Symphytum officinale\*\)](#). *BMC Bioinformatics*. 2006 Sep 26;7 Suppl 2:S16. [Epub ahead of print]

Mountziaris PM, Spicer PP, Kasper FK, Mikos AG. Harnessing and Modulating Inflammation in Strategies for Bone Regeneration. *Tissue Engineering: Part B*, Vol 17(6), 2011, Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0182.

Pozetti GL. *Symphytum officinale*, sua toxicologia e a respectiva patogenesia registrada na literatura homeopática. *Pesqui Homeopa*. 1991; 6(1): 29-33.

Rahn, BA. Bone healing: histologic and physiologic concepts. In: Fackelman, GE., editor. *Bone in clinical orthopedics*. Thieme; Stuttgart, NY: 2002. p. 287-326.

Ribeiro Filho, Ariovaldo. Repertório Homeopático. São Paulo: Robe editorial, 1995.

Rode D. Comfrey toxicity revisited. *Trends Pharmacol Sci*. 2002 Nov; 23(11): 497-9.

Sakakura CE, Neto RS, Bellucci M, Wenzel A, Scaf G, Marcantonio E Jr. [Influence of homeopathic treatment with comfrey on bone density around titanium implants: a digital subtraction radiography study in rats.](#) Clin Oral Implants Res. 2008 Jun;19(6):624-8. Epub 2008 Apr 16.

Sfeir, C.; Ho, L.; Doll, BA.; Azari, K.; Hollinger, JO. Fracture repair. In: Lieberman, JR.; Friedlaender, GE., editors. Bone regeneration and repair. Humana Press; Totowa, NJ: 2005. p. 21-44.

Shapiro, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. European Cells and Materials 2008; Vol 15: 53-76

Sigolo RP. Pensamento médico e história: um breve ensaio. Rev Hist Reg. 1996;1(1): 145-58.

Spin-Neto R, Belluci MM, Sakakura CE, Scaf G, Pepato MT, Marcantonio Jr E. Homeopathic *Symphytum officinale* increases removal torque and radiographic bone density around titanium implants in rats. Homeopathy. 2010;99(4):249-54.

Staiger C. Comfrey: a clinical overview. Phytotherapy Research. 2012. Feb; doi: 10.1002/ptr.4612.

Stickel F, Patsenker E, Schuppan D. [Herbal hepatotoxicity.](#) J Hepatol. 2005 Nov;43(5):901-10.

Stickel F, Seitz HK. [The efficacy and safety of comfrey.](#) Public Health Nutr. 2000 Dec;3(4A):501-8.

Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Rev Bras Ciênc Farm. 2006 Jun; 42(2):289-306.

Tyler M L. *Retratos de Medicamentos Homeopáticos*. São Paulo, Brasil: Livraria Editora Santos, 1992, 181-187 p.

Vaz APA, Jorge MHA. Confrei [Folheto on line]. Corumbá: EMBRAPA; 2006. (Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas). [Acesso 22 Ago 2011]. Disponível em: <http://www.campinas.snt.embrapa.br/plantasMedicinais/confrei.pdf>

Victoria G, Petrisor B, Drew B, Dick D. Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss? IJO. 2009; 43(2):117-20.

Vijnovsky B. *Tratado de Materia Medica Homeopatica*. Buenos Aires, Argentina, autorizado impressão em São Paulo, Brasil: Rumo Gráfica Editora Ltda. 1992, 331-336 p.

Werkman C, Senra, GS, Rocha RF, Brandão AAH. Comparative therapeutic use of Risedronate and *Calcareo phosphorica* – alopthy versus homeopathy – in bone repair in castrated rats. Braz Oral Res. 2006; 20(3): 196-201.

Yeong ML, Clark SP, Waring JM, Wilson RD, Wakefield SJ. The effect of comfrey derived pyrrolizidine alkaloids on rat liver. Pathology. 1991; 23:35-8.

Yeong ML, Wakefield SJ, Ford HC. Hepatocyte membrane injury and bleb formation following low dose comfrey toxicity in rats. Int J Exp Pathol. 1993 Apr; 74(2):211-7.