



Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



Artigo de revisão

Papel da homeopatia na regulação da foliculogênese in vivo e in vitro



Laritza Ferreira de Lima*, Jamily Bezerra Bruno, Ana Paula Ribeiro Rodrigues e José Ricardo de Figueiredo

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Foliculos Pré-Antrais, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 16 de março de 2016

Aceito em 3 de abril de 2016

On-line em 17 de maio de 2016

Palavras-chave:

Técnica in vitro

Folículo ovariano

Homeopatia

Hormônio folículo estimulante

R E S U M O

A homeopatia apresenta-se como uma excelente opção de baixo custo e toxicidade para uso na prática da reprodução tanto humana quanto animal. Entretanto, desperta um alto nível de ceticismo em relação a sua real eficácia, notadamente devido ao possível efeito placebo. O uso de modelos in vitro, como a tecnologia do ovário artificial, apresenta-se como uma ferramenta de grande precisão para dirimir tal controvérsia. Diante disso, esta revisão tem como objetivo fornecer algumas bases sobre a foliculogênese e sua regulação, relatar a importância do cultivo in vitro, com ênfase no hormônio folículo estimulante (FSH), na avaliação do papel dos medicamentos homeopáticos no tratamento de distúrbios reprodutivos ovarianos e no seu uso para melhorar as biotécnicas reprodutivas.

© 2016 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Role of homeopathy in vivo and in vitro regulation of folliculogenesis

A B S T R A C T

The homeopathy is a low-cost and toxicity alternative to using in the human and animal reproduction. However, the effect homeopathy awakens a skepticism about its effectiveness, because of the possible placebo effect. The in vitro models, as artificial ovary, is a excellent tool to resolve this controversy. Therefore, the aim of this review to provide some basis on folliculogenesis and its regulation, to report the importance of in vitro culture, with an emphasis on follicle stimulating hormone (FSH), in assessing the role of homeopathic

Keywords:

In vitro technique

Ovarian follicle

Homeopathy

Follicle stimulating hormone

* Autor para correspondência.

E-mail: jrf.lamofopapapers@gmail.com (L.F. de Lima).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2016.04.004>

1413-2087/© 2016 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

medicines in treating ovarian reproductive disorders and its use to improve reproductive biotechnologies.

© 2016 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

Os problemas de fertilidade têm aumentado em todas as partes do mundo.¹ Devido a esse fato, pesquisadores têm melhorado e desenvolvido novas técnicas de reprodução assistida com o objetivo de possibilitar à mulher ter filhos saudáveis. Além disso, essas biotécnicas são usadas com o objetivo de melhorar a fertilidade de animais de alto valor zootécnico, preservar espécies em extinção e fazer testes farmacotoxicológicos.^{2,3}

Essas biotécnicas são normalmente *in vivo*, por meio da administração direta de substâncias que irão regular o desenvolvimento folicular.⁴ Entretanto, tais substâncias, como por exemplo o FSH, apresentam em geral alto custo e efeitos colaterais.⁵⁻⁷

A homeopatia apresenta-se como uma excelente opção de baixo custo e toxicidade para uso na prática da reprodução tanto humana quanto animal. A homeopatia tem como base o tratamento com pequenas quantidades de drogas extremamente diluídas capazes de curar uma patologia. Os medicamentos homeopáticos são usados em dose mínima, ou seja, na quantidade de uma substância que poderia ser dada para evitar seus efeitos colaterais e ainda assim continuaria a trazer uma resposta regulatória.^{8,9} Entretanto, o uso da homeopatia desperta um alto nível de ceticismo em relação a sua real eficácia, notadamente devido ao possível efeito placebo.^{10,11} O uso de modelos *in vitro*, como a tecnologia do ovário artificial por meio do cultivo *in vitro*,^{12,13} apresenta-se como uma ferramenta de grande precisão para dirimir tal controvérsia.

Diante disso, esta revisão tem como objetivo relatar a importância do cultivo *in vitro*, com ênfase no hormônio folículo estimulante (FSH), para avaliar o papel dos medicamentos homeopáticos no tratamento de distúrbios reprodutivos ovarianos e o seu potencial uso para melhorar as biotécnicas reprodutivas.

Bases gerais da foliculogênese

Na maioria dos mamíferos, o ovário é composto por duas regiões principais: uma interna (medular), responsável pela sustentação desse órgão, e uma mais externa (cortical), na qual podem ser encontrados folículos e corpos lúteos em diferentes estágios de desenvolvimento. Esse órgão é responsável pela produção de fatores de crescimento e hormônios, além de produzir gametas femininos potencialmente fertilizáveis (oócitos), que se encontram dentro de uma estrutura denominada folículo.¹⁴

A população de folículos no ovário varia de milhares a milhões (1.500 em camundongos;¹⁵ 2.500.000 em humanas¹⁶)

e pode ser influenciada por fatores como espécie, etnia, genética,^{17,18} idade¹⁹ e estado reprodutivo.²⁰ Na época do nascimento, a depender da espécie de mamífero, o ovário contém sua quota máxima de folículos primordiais, os quais estão quiescentes e contêm todos os oócitos potencialmente disponíveis para fertilização durante toda a vida fértil.²¹ Embora muitos cientistas acreditem que o estoque de folículos ovarianos seja finito e não renovável, estudos apresentam evidências de que pode ocorrer uma pequena renovação na população folicular através da diferenciação das células troncos presentes no ovário, a neofoliculogênese.^{22,23}

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo pré-ovulatório.²⁴ Durante o processo da foliculogênese, a morfologia folicular é alterada devido ao crescimento oocitário, à proliferação e à diferenciação das células da granulosa (CG), ao aparecimento das células da teca (CT), à zona pelúcida e uma cavidade repleta de líquido folicular denominada antra.²⁵

De acordo com o aspecto morfológico, os folículos podem ser classificados em dois grandes grupos: pré-antrais (Fopa), ou não cavitários, e antrais (FOA), ou cavitários²⁶ (fig. 1). Os Fopa representam mais de 90% da população folicular do ovário²⁷ e podem ser classificados em primordial, de transição, primário e secundário. Já os FOA são representados pelos folículos terciários e pré-ovulatórios. Os folículos primordiais encontram-se em estado de quiescência,^{28,29} são posteriormente ativados, passam a se desenvolver para estádios mais avançados, que culminam com a formação do folículo pré-ovulatório. No entanto, durante a vida reprodutiva das fêmeas, apesar de muitos folículos serem ativados, apenas uma pequena parte (0,01%) é capaz de se desenvolver até a ovulação, a grande maioria (99,9%) é perdida por um processo natural conhecido como atresia (morte folicular)³⁰ (fig. 1).

Regulação da foliculogênese e importância do hormônio folículo estimulante

Durante a vida reprodutiva das fêmeas, o desenvolvimento folicular depende da perfeita interação entre fatores autoócrinos, parácrinos e endócrinos.³¹ Nos processos parácrinos e autócrinos, o próprio oócito desempenha um papel importante na determinação do seu próprio destino através da produção de fatores de crescimento (como, por exemplo, a proteína morfogenética óssea 15 [BMP15] e o fator de crescimento e diferenciação 9 [GDF9]), que vão interagir com as células somáticas (células da granulosa e teca) e proporcionar o desenvolvimento folicular. Tanto as células da granulosa (CG) como as células da teca (CT) também produzem seus próprios fatores parácrinos (kit ligand [KL], ativinas, inibinas,

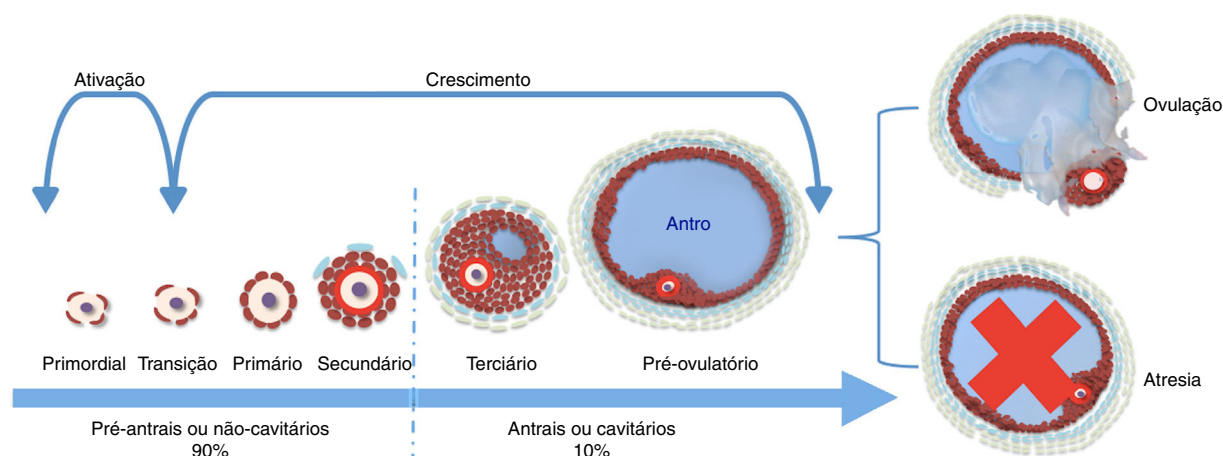


Figura 1 – Representação esquemática da foliculogênese e dos estádios foliculares.

hormônio antimülleriano [AMH]) e os hormônios esteróides (estradiol, progesterona e testosterona), os quais, além de coordenar o crescimento do oócito, regulam a proliferação das CG e diferenciação das CT.³²⁻³⁴

Na regulação endócrina, diversos hormônios promovem o desenvolvimento folicular, dentre eles podemos destacar o FSH. O FSH é uma glicoproteína secretada pela hipófise anterior e é composto por duas subunidades α e β . A primeira é comum a outros hormônios hipofisários, ao passo que a subunidade β confere especificidade a esse hormônio. Apenas o dímero maduro do FSH consegue se ligar a seu receptor (FSHR).³⁵ Esse hormônio apresenta como principal função o desenvolvimento e a maturação gonadal durante a puberdade, além de promover a sobrevivência, o crescimento folicular e finalmente a seleção (recrutamento) e o desenvolvimento de

foliculos dominantes,³⁶ que precedem o processo de ovulação (fig. 2).

O receptor de FSH (FSHR) se localiza na superfície de CG a partir de folículos primordiais ou primários, embora existam trabalhos que relatam sua presença em oócitos.³⁶⁻³⁸ Esse receptor é membro da família de receptores acoplados à proteína G. A ativação do FSHR provoca eventos de sinalização, a maior parte iniciada pela ativação da adenilato ciclase, seguida da produção de AMPc, da ativação da proteína quinase A e da fosforilação de outras proteínas. Além disso, a ativação desse receptor está associada com o aumento de cálcio intracelular, a ativação de MAP quinase e a estimulação do trifosfato de inositol.³⁹ Todas as vias de sinalização do FSH juntas promovem a ativação de mais de 100 genes com funções diferentes nas CG⁴⁰ (fig. 3).

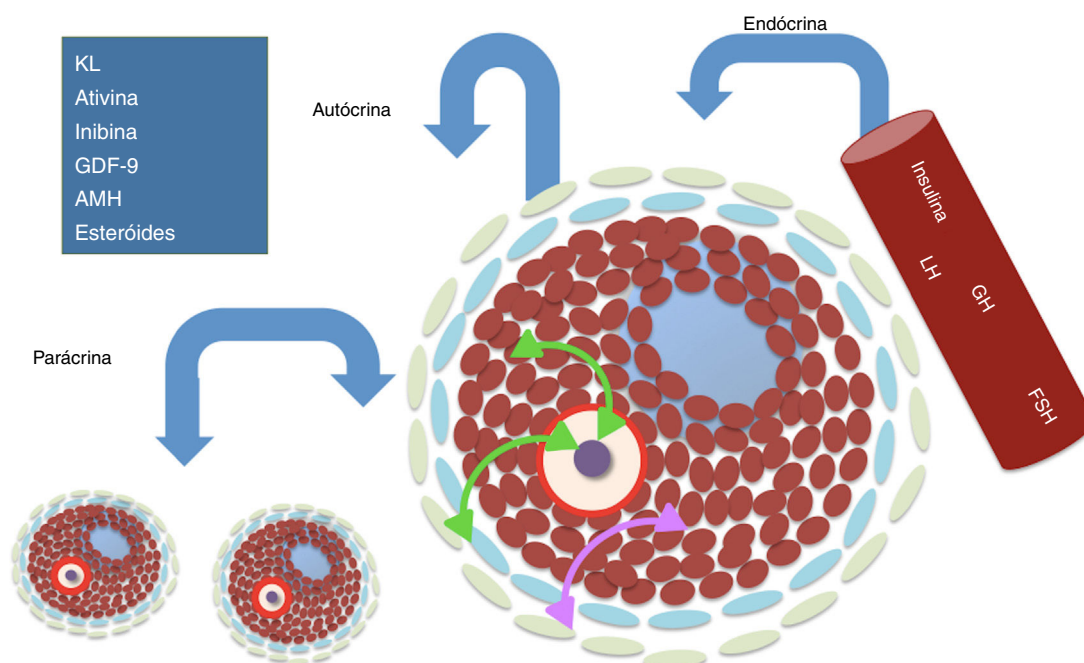


Figura 2 – Representação esquemática da regulação foliculogênese.

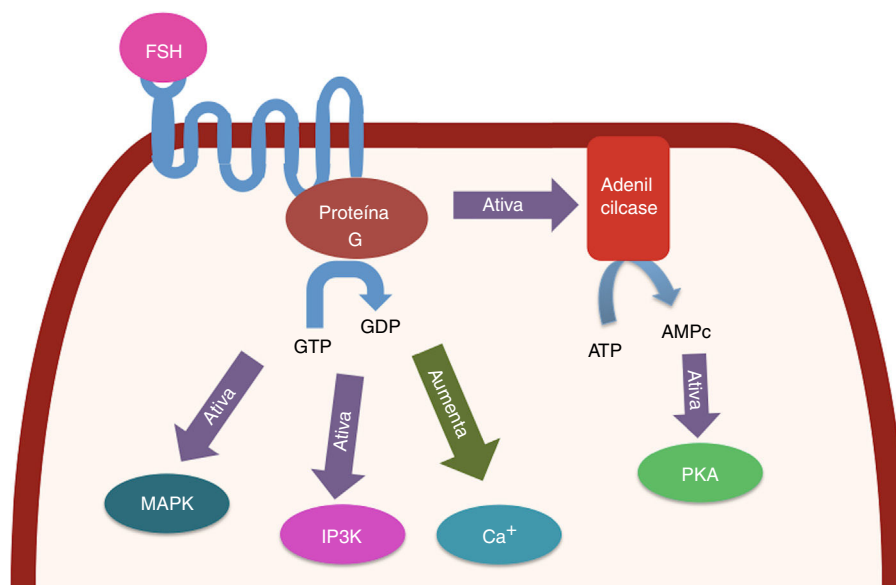


Figura 3 – Vias de sinalização do FSH nas células da granulosa.

Foliculogênese *in vitro*: importância da tecnologia do ovário artificial

Como mencionado anteriormente, o ovário é composto por uma grande população de Fopa, a grande maioria morre e apenas uma pequena porcentagem alcança a ovulação e torna o rendimento ovariano (número de ovulações durante a vida em relação ao total de folículos presentes) muito baixo. Assim, com o intuito de evitar a grande perda folicular *in vivo* devido a atresia, a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (Moifopa), também conhecida como Ovário Artificial, vem sendo desenvolvida na tentativa de: 1) elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da foliculogênese inicial; 2) fazer testes *in vitro* da ação de fármacos (benéfica ou tóxica), radioatividade, vacinas imunoesterilizantes e nanopartículas sobre os oócitos, que se apresentam como uma opção ao uso de animais em experimentos; 3) produzir bancos genéticos (germoplasma); 4) aperfeiçoar a reprodução assistida de humanos e animais.²⁶

Grandes progressos já foram obtidos com o cultivo *in vitro* de Fopa em espécies animais. Carrol et al.⁴¹ e O'Brien et al.⁴² obtiveram o nascimento de camundongos a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro*. Nas espécies domésticas, os resultados da PIV têm se limitado a um pequeno e variável número de embriões a partir de folículos secundários crescidos *in vitro* (suíno – Wu et al.,⁴³ ovinos,⁴⁴ caprinos⁴⁵).

A eficiência da Moifopa pode ser afetada por fatores como o tipo de sistema de cultivo usado; a composição do meio de base; a concentração e associação de fatores adicionados ao meio de cultivo.^{26,46} No tocante aos sistemas de cultivo, os folículos ovarianos podem ser cultivados inclusos no próprio tecido ovariano ou no ovário inteiro (cultivo *in situ*); ou ainda na forma isolada (cultivo de folículos isolados).⁴⁷ Em adição,

pode ainda ser feito um cultivo em dois passos, no qual é feito primeiramente o cultivo *in situ*, o que permite a ativação e o desenvolvimento do folículo primordial até estágio secundário, para posteriormente ser isolado e cultivado até o estágio antral.⁴⁸

A composição do meio é outro fator importante para a obtenção de sucesso durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Uma variedade de meios de base tem sido usada para o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais em muitas espécies, dentre eles o meio essencial mínimo (MEM);⁴⁹ meio McCoy's⁴⁸ e α -MEM.⁵⁰ Esses meios são ainda comumente suplementados com diferentes substâncias, bem como diferentes fatores de crescimento (Telfer et al. 2008) e hormônios, tal como o FSH.⁵¹

Estudos *in vitro*, em caprinos, têm demonstrado que o FSH atua na manutenção da sobrevivência, ativação e no crescimento de Fopa iniciais.^{51,52} Outros estudos observaram que o FSH, nos estágios mais avançados, promove a formação de antro e o crescimento folicular, reduz a apoptose, estimula a síntese de esteroides e a expressão de receptores para outras substâncias-chave da foliculogênese,⁵³⁻⁵⁶ além de melhorar a aquisição da competência meiótica, a fecundação e o desenvolvimento embrionário a partir de oócitos oriundos de Fopa cultivados *in vitro*.^{56,57}

O FSH, usado no cultivo *in vitro*, pode ser extraído da urina de mulheres pós-menopáusicas, bem como de extrato de hipófise de animais domésticos, como o FSH porcino (FSHp), além de poder ser produzido a partir da tecnologia recombinante (FSHr).⁵⁸ O FSHr é mais puro e homogêneo, o que poderia propiciar uma maior eficácia nos resultados de crescimento folicular,⁵⁹ é mais eficiente do que o FSH urinário ou porcino no crescimento de folículos murinos e caprinos cultivados *in vitro*.^{52,60} No entanto, a adição dessas substâncias torna o procedimento bastante oneroso, é necessário o estudo de opções, como, por exemplo, a homeopatia.

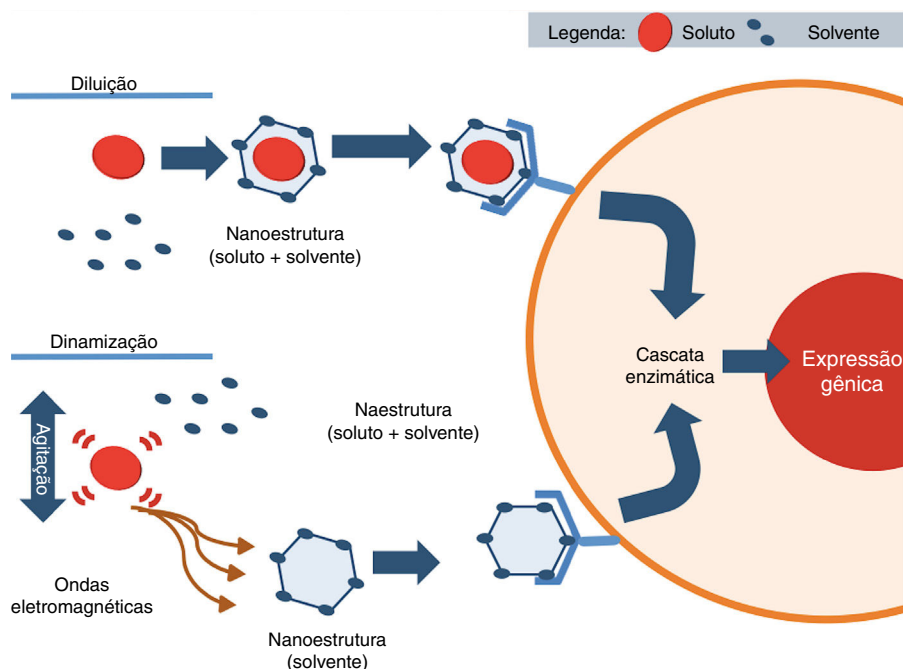


Figura 4 – Hipótese para o mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos. Durante o processo de diluição o soluto interage com o solvente e cria a sua volta uma nanoestrutura de solvente (gaiola → solvente + soluto) que irá intermediar a ligação desse soluto com o seu receptor celular. No caso da homeopatia, o soluto durante a dinamização gera ondas eletromagnéticas que formaram nanoestrutura somente com solvente que irá se ligar ao receptor celular, desencadear a mesma cascata enzimática e ativar os genes celulares.

Papel da homeopatia no tratamento da disfunção ovariana em humanos e animais

A homeopatia é um método terapêutico criado em 1796, por Samuel Hahnemann, que surgiu através de observações e experimentações dos efeitos dos medicamentos em homens saudáveis e tem como princípio a cura pelo semelhante.^{61,62} O ponto de partida para preparação da maioria dos medicamentos homeopáticos é a tintura-mãe, um extrato alcoólico (diluído em etanol cereal) da substância original. Essa solução passa por um processo denominado potenciação, que consiste em diluições, em um diluente inerte, álcool ou água, alternadas com dinamizações.^{10,63} Durante o processo de dinamização, acredita-se que sejam transmitidas ao diluente as propriedades da substância de origem.^{10,62,64}

Uma série de homeopatas tem proposto hipóteses para explicar o mecanismo de ação da homeopatia e de que forma o diluente captaria as “informações” do soluto (fig. 4). Davydov⁶⁵ acredita que durante o processo de dinamização o soluto poderia liberar sua energia ativa para o solvente, através da quebra de algumas das suas diminutas partículas do seu átomo. Outros cientistas⁶⁶⁻⁶⁹ citam a possibilidade de que o soluto, durante as agitações, gere ondas eletromagnéticas de baixa frequência,^{68,69} que induzem a formação de nanoestruturas estáveis, as quais são capazes de ativar um receptor⁷⁰ (fig. 4).

A prescrição de um medicamento homeopático varia de acordo com a sintomatologia apresentada pelo paciente. O mesmo medicamento pode ser empregado para tratar

diversas doenças, apenas se altera o número de dinamizações usadas. Alguns homeopatas afirmam em consenso que as baixas dinamizações (inferiores a 6 cH) atuam na parte física do organismo e corrigem lesões, enquanto as médias (7-12 cH) regulam funções e as altas (acima de 12 cH) atuam no lado mental do paciente. Na reprodução, dinamizações baixas de hormônios são indicadas para estimular a fertilidade, as médias para regular, as altas podem ser usadas para frenar ou regular os processos relacionados a fertilidade feminina.⁷¹

A homeopatia é usada com sucesso em mulheres com distúrbios hormonais e infertilidade, melhora significativamente as alterações hormonais e normaliza a menstruação.^{72,73} Com relação aos problemas de fertilidade ligados ao desenvolvimento folicular adequado, a homeopatia também tem sido bastante eficiente no tratamento de ovário policístico e cisto de ovário.¹

Medicamentos homeopáticos, tais como o *Folliculinum*, são usados para restaurar a fertilidade e regular o ciclo menstrual. Medicamentos oriundos de gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH) também são usados. O FSH em baixas dinamizações (FSH 6 cH) é aplicado para estimular os folículos ovarianos, é também bastante usado no tratamento de infertilidade.⁷¹ Já o medicamento com LH estimula a produção de esteroides, além de tratar infertilidade e distúrbios de ovulação.⁷¹

Em animais, essa terapia é usada em sistemas de produção da pecuária, principalmente na orgânica, uma vez que tem a vantagem de manter o equilíbrio animal, atua pela redução do estresse e na manutenção do bem-estar animal. Além de ser de fácil administração, não produz resíduos e não contamina, portanto, o meio ambiente.⁷⁴

Medicamentos tais como *Aristolochia clematis*, *Graphites*, *Iodum*, *Kalium iodatum* e *Aurum metallicum* são usados para regular o ciclo estral e aumentar os sinais do estro em vacas.⁷⁵ Além disso, o *Iodum* e o *Kalium iodatum* são indicados para tratar hiperplasia e atrofia dos ovários de vacas.⁷⁵ Rajkumar et al.⁷⁶ verificaram a eficiência do complexo homeopático (*Calcarea phosphorica*, *Aletris farinosa*, *Pulsatilla*, *Aurum muriaticum natronatum*, *Sepia* e *Phosphorus*, todos a uma potência de 30 cH) no tratamento de anestro em vacas, o qual mostrou ser bastante eficiente por apresentar uma indução de 100% de estro.

O uso de combinações de medicamentos homeopáticos também foi descrito para a redução do anestro em búfalas.⁷⁷ Kumar et al.⁷⁷ trataram 25 vacas e seis búfalas em anestro com os mesmos medicamentos e dosagens, foi alcançada indução de estro em 68% e 50% em vacas e búfalas, respectivamente. Silva et al.⁷⁸ usaram o medicamento *Pulsatilla nigricans* para redução do puerpério em vacas de corte e de leite. Dos 353 bovinos usados no estudo, 127 vacas apresentaram redução do período de anestro logo após o parto.

Importância do modelo in vitro do ovário artificial para avaliação da eficiência de medicamentos homeopáticos com ação no ovário

Embora existam muitos estudos e relatos *in vivo* publicados na literatura, os estudos relacionados a terapia homeopática na reprodução feminina ainda são bem recentes, foram feitos testes na foliculogênese *in vitro* somente partir de 2012. Nosso grupo de pesquisa (Lamofopa-Favet-Uece) foi o primeiro a investigar a influência de medicamentos diluídos/dinamizados na foliculogênese *in vitro*.

Neste primeiro trabalho, fizemos um cultivo de fragmentos ovarianos de ovinos por sete dias na presença de diferentes dinamizações de FSH (FSH 6, 12 e 30 cH), adicionado diariamente ou a cada dois dias ao meio de cultivo. Durante esse trabalho inovador, confirmaram-se dados da literatura *in vivo* que relataram ação diferenciada das potências (Legros et al., 2010), visto que o cultivo a baixa dinamização (FSH 6 cH) estimulou o crescimento folicular, enquanto a alta (FSH 30 cH) reduziu esse crescimento. Além disso, FSH 6 cH adicionado diariamente mostrou resultado superior ao seu veículo (álcool cereal) na sobrevivência e ativação folicular precoce (após um dia), bem como na viabilidade e ultraestrutura desses folículos em relação ao controle fresco.¹³ Esses resultados foram semelhantes àqueles obtidos com o FSH no cultivo *in vitro* de Fopa caprino incluso em tecido ovariano.^{51,52} No entanto, ainda não haviam sido comparadas essas duas apresentações (FSH homeopático vs. FSH alopatóico) em uma mesma condição experimental.

Recentemente, nossa equipe comparou o efeito dessas duas apresentações (FSH 6 cH e FSHr) no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos ovinos inclusos em tecido ovariano. Novamente verificou-se que o FSH 6 cH melhora a sobrevivência e promove a ativação precoce (após um dia) quando comparado com o meio de cultivo controle, enquanto o FSHr melhora somente a ativação tardia (sete dias) em relação ao controle cultivado. Além disso, em todos os parâmetros (sobrevivência, ativação e crescimento folicular e oocitário), exceto na ativação precoce, essas duas apresentações foram

semelhantes,¹² provaram que o FSH homeopático (FSH 6 cH) pode substituir o FSH alopatóico no meio de cultivo de FOPA ovino.

Na observação do efeito positivo do FSH homeopático na foliculogênese *in vitro* na fase pré-antral inicial (ativação de folículos primordiais), decidiu-se iniciar um estudo para investigar possíveis efeitos da homeopatia (FSH 6 cH) na foliculogênese pré-antral tardia. Usou-se para tanto o cultivo de folículos pré-antrais secundários isolados na espécie ovina. Nossa equipe, portanto, tem cultivado folículos secundários ovinos e suínos isolados, foi observado um comportamento diferente do FSH homeopático na fase pré-antral tardia quando comparado com a fase pré-antral inicial. Em ovinos, verificou-se que o efeito do FSH homeopático (FSH 6 cH) sobre o desenvolvimento folicular e sobre a produção hormonal foi devido em parte ao veículo do FSH dinamizado, isto é, o álcool cereal (Lima et al., dados não publicados). Já em suínos, a homeopatia (ou tratamento homeopático ou adição de FSH 6 cH) promoveu um aumento na formação da cavidade antral e na produção de progesterona e testosterona em relação ao tratamento que continha somente meio de cultivo. Além disso, FSH 6 cH aumentou a produção de progesterona significativamente em relação ao seu veículo (Lima et al., dados não publicados). Esses resultados demonstraram que a homeopatia pode atuar de forma diferente do veículo sobre o desenvolvimento folicular, esse efeito provavelmente é influenciado pela espécie animal, duração de cultivo e composição do meio de cultivo.

Por fim, fez-se um cultivo de fragmentos de tecido ovariano suíno na presença de diferentes medicamentos homeopáticos (FSH 6 cH, *Pulsatilla* 6 cH e *Bos Stress Fertilis* 6 cH). Nesse estudo, verificou-se que todos os medicamentos atuam na ativação folicular, mas FSH 6 cH e *Pulsatilla* 6 cH melhoram o crescimento folicular e oocitário, enquanto *Bos Stress Fertilis*® (complexo homeopático) atua na sobrevivência e ativação de folículos suínos inclusos em tecido ovariano (Nunes et al., dados não publicados). Vale a pena ressaltar que a adição do veículo homeopático não melhorou significativamente qualquer dos parâmetros avaliados quando comparada com o controle cultivado.

Considerações finais

Apesar do elevado nível de ceticismo em relação ao uso da homeopatia no controle da fisiologia reprodutiva, estudos científicos sérios têm demonstrado eficácia das substâncias homeopáticas, como o FSH, no tratamento de distúrbios reprodutivos. Além disso, a tecnologia do ovário artificial, modelo *in vitro* de estudo da foliculogênese, tem contribuído de forma decisiva para comprovar a eficiência da homeopatia em condições controladas de estudo. Dessa forma, a homeopatia apresenta-se como uma opção de baixo custo e toxicidade para o uso na reprodução. Futuros estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação das drogas homeopáticas.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Sinsen J. Role of homeopathy in managing male and female infertility Abstract. *Eur J Integr Med.* 2010;2:217-65.
2. Langbeen AN, De Porte HFM, Bartholomeus E, Leroy JLMR, Bols PEJ. Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. *Theriogenology.* 2015;84:477-89.
3. Figueiredo JR. Advances in goat artificial ovary. IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction, Campinas, SP, Brazil. *Anim Reprod.* 2012:816.
4. Silva JR, van den Hurk R, Figueiredo JR. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domest Anim Endocrinol.* 2016;55:123-35.
5. Teixeira MZ. Distúrbios do climatério e tratamento homeopático. *Homeop Brasil.* 2002;8:29-43.
6. Cetin I, Cozzi V, Antonazzo P. Infertility as a cancer risk factor – A review. *Placenta.* 2008;29:S169-77.
7. Loprinzi CL, Michalak JC, Quella SK, O'fallon JR, Hatfield AK, Nelimark RA, et al. Megestrol acetate for the prevention of hot flashes. *N Engl J Med.* 1994;331:347-52.
8. Trichard M, Lamure E, Chaufferin G. Study of practice of homeopathic general practitioners in France. *Homeopathy.* 2003;92:135-9.
9. Teixeira MZ. New homeopathic medicines: use of modern drugs according to the principle of similitude. *Homeopathy.* 2011;100:244-52.
10. Khuda-Bukhsh AR. Laboratory research in homeopathy: pro. *Integr Cancer Ther.* 2006;5:320-32.
11. Bellavite P, Marzotto M, Oliosio D, Moratti M, Conforti A. High dilution effects revisited: pharmacodynamic mechanisms. *Homeopathy.* 2014;103:22-43.
12. Lima LF, Rocha RPM, Alves AMCV, Carvalho AA, Chaves RN, Lopes CAP, et al. Comparison between the additive effects of diluted (rFSH) and diluted/dynamized (FSH 6 cH) recombinant follicle-stimulating hormone on the in vitro culture of ovine preantral follicles enclosed in ovarian tissue. *Complement Ther Med.* 2016;25:39-44.
13. Lima LF, Rocha RM, Alves AM, Saraiva MV, Araújo VR, Lima IM, et al. Dynamized follicle-stimulating hormone affects the development of ovine preantral follicles cultured in vitro. *Homeopathy.* 2013;102:41-8.
14. Saumande J. Ovogenèse et folliculogenèse. *Rec Méd Vét.* 1991;157:29-38.
15. Shaw JM, Cox SL, Trounson AO, Jenkin G. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;161:103-10.
16. Wallace WHB, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One.* 2010;5:e8772.
17. Smith P, O WS, Hudson NL, Shaw L, Heath DA, Condell L, et al. Effect of the Booroola gene (FecB) on body weight, ovarian development and hormone concentrations during fetal life. *J Reprod Fertil.* 1993;98:41-54.
18. Silva-Santos KC, Santos GMG, Siloto LS, Hertel MF, Andrade ER, Rubin MIB, et al. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology.* 2011;76:1051-7.
19. Roy SK, Treacy BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril.* 1993;59:783-91.
20. Erickson GF. An analysis of follicle development and ovum maturation. *Sem Reprod Endocrinol.* 1986;4:233-54.
21. Grive KJ, Freiman RN. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development.* 2015;142:2554-63.
22. Silva-Santos KC, Marinho LSR, Santos GMG, Machado FZ, Gonzalez SM, Lisboa LA, et al. Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. *Anim Reprod.* 2013;10(3):180-6.
23. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell.* 2005;122:303-15.
24. Van Den Hurk R, Zhao H. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* 2005;63:1717-51.
25. Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology.* 2006;66:5-13.
26. Figueiredo JR, Celestino JJH, Rodrigues APR, Silva JRV. Importância da biotécnica de Moifopa para o estudo da folículo genese e produção in vitro de embriões em larga escala. *Rev Bras Reprod Anim.* 2007;31:143-52.
27. Saumande J, Cahill LP, Ravault JP, Blanc M, Thimonier J, Mariana JC. Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. *J Reprod Fertil.* 1981;62:141-50.
28. Cortvriendt R, Smits JEJ. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. *Reprod Domest Anim.* 2001;36:3-9.
29. Qu J, Godin PA, Nisolle M, Donnez J. Expression of receptors for insulinlike growth factor-I and transforming growth factor-β in human follicles. *Mol Hum Reprod.* 2000;6:137-45.
30. Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod.* 2008;23:699-708.
31. Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2003;78:135-63.
32. Li R, Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:141-52.
33. Gosden R, Lee B. Portrait of an oocyte: our obscure origin. *J Clin Invest.* 2010;120:973-83.
34. Sugiura K, Eppig JJ, Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2005. Control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulosa cells by mouse oocytes. *Reprod Fertil Dev.* 2005;17:667-74.
35. Brown P, McNeilly AS. Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes. *Rev Reprod.* 1999;4:117-24.
36. Xu Z, Gaverik HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod.* 1995;53:951-7.
37. Méduri G, Charnaux N, Driancourt MA, Combettes L, Granet P, Vannier B, et al. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:2266-76.
38. Barros VRP, Cavalcante AYP, Macedo TJS, Barberino RS, Lins TLB, Gouveia TLB, et al. Immunolocalization of melatonin and follicle-stimulating hormone receptors in caprine ovaries and their effects during in vitro development of isolated preantral follicles. *Reprod Dom Anim.* 2013;48:1025-33.
39. Nataraja SG, Yu HN, Palmer SS. Discovery and development of small molecule allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors. *Front Endocrinol.* 2015;6:142.
40. Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal.* 2006;18:1351-9.
41. Carrol J, Whittingham DG, Wood MJ. Growth in vitro and acquisition of meiotic competence after the cryopreservation of isolated mouse primary ovarian follicles. *Reprod Fertil Dev.* 1991;3:593-9.
42. O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles

- dramatically improves their development competence. *Biol Reprod.* 2003;8:1682-6.
43. Wu J, Emery BR, Carrell DT. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod.* 2001;64:375-81.
 44. Arunakumari G, Shanmugasundaram N, Rao VH. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology.* 2010;74:884-94.
 45. Saraiva MVA, Rossetto R, Brito IR, Celestino JJH, Silva CMG, Faustino LR, et al. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. *Reprod Sci.* 2010;17:1135-43.
 46. Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction.* 2008;136:703-15.
 47. Van Den Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bevers MM. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod.* 2000;6:457-74.
 48. Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod.* 2008;23:1151-8.
 49. Newton H, Picton HM, Gosden RG. In vitro growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *J Reprod Fertil.* 1999;115:141-50.
 50. Celestino JJ, Lima-Verde IB, Bruno JB, Matos MH, Chaves RN, Saraiva MV, et al. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on in vitro development and survival of preantral follicles. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;338:1-9.
 51. Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia JE Jr, Silva JRV, Celestino JJH, et al. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote.* 2007;15:173-82.
 52. Magalhães DM, Araujo VR, Lima-Verde IB, Matos MHT, Silva RC, Lucci CM, et al. Different Follicle Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development in vitro. *Brazil J Vet Research Anim Sci.* 2009;46:378-86.
 53. Nilsson E, Skinner MK. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J Soc Gynecol Invest.* 2001;8:17-20.
 54. Pakarainen T, Zhang F, Nurmi L, Poutanen M, Huhtaniemi I. Knockout of luteinizing hormone receptor abolishes the effects of follicle-stimulating hormone on preovulatory maturation and ovulation of mouse graafian follicle. *Mol Endocrinol.* 2005;19:2591-602.
 55. Thomas FH, Ethier JF, Shimasaki S, Vanderhyden BC. Follicle stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology.* 2005;146:941-9.
 56. Arunakumari G, Vagdevi R, Rao BS, Nake BR, Naidu KS, Suresh Kumar RV, et al. Effect of hormones and growth factors on in vitro development of sheep preantral follicles. *Small Rum Research.* 2007;70:93-100.
 57. Wu J, Tian Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle in vitro. *Zygote.* 2007;15:233-40.
 58. Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ. Responsiveness of bovine cumulus- oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2003;14:1-12.
 59. Closset J, Hennen G. Biopotency of highly purified porcine FSH and human LH on gonadal function. *J Endocrinol.* 1989;120:89-96.
 60. Calongos G, Hasegawa A, Komori S, Koyama K. Comparison of urinary and recombinant follicle stimulating hormone in vitro growth, maturation and fertilization of mouse preantral follicles. *Fertil Steril.* 2008;89:1482-9.
 61. Fontes OL. Farmácia homeopática: teoria e prática. 2ª ed. Barueri: Manole; 2005.
 62. Hahnemann S. Organon da arte de curar. São Paulo: Industria Gráfica e Editora; 1996.
 63. Steinberg D, Beal MW. Homeopathy and women's health care. *J Obstet Gynecol Neonatal.*
 64. Teixeira MZ. Pesquisa básica em homeopatia: revisão bibliográfica. *Rev. Homeopatia (São Paulo).* 2001;66:5-26.
 65. Davydov AS. Energy and electron transport in biological systems. In: Ho MW, POPP, FA, Warnke U, eds. *Bioelectrodynamics and Biocommunication.* London: World Scientific, 1994, p. 411-430.
 66. Conte RR, Berliocchi H, Lasne Y, Vernot G. Théorie des hautes dilutions et aspects experimentaux. Paris: Polytechnica1; 1996. p. 64.
 67. Conte RR, Berliocchi H, Lasne Y, Vernot G. Theory of high dilutions and experimental aspects: application to life. Paris: Dydol; 2000. p. 122.
 68. Lo SY, Li WC, Huang Sh. Water Clusters in Life. *Med Hypotheses.* 2000;54:2000.
 69. Zhou KX, Lu GW, Zhou QC, Song JH, Jiang ST, Xia HR. Monte Carlo simulation of liquid water in a magnetic field. *J Appl Physics.* 2000;88:1802-5.
 70. Anagnostatos GS. Small water clusters (clathrates) in the homeopathic preparation process. In: Endler PC, Schulte J, editors. *Ultra high dilution physiology and physics.* Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1994. p. 121-8.
 71. Legros MS. Utilización de la homeopatía en endocrinología ginecológica. Uso terapéutico de las hormonas diluidas y dinamizadas. *Rev Med Homeopat.* 2010;3:9-13.
 72. Gerhard, I. Unfruchtbarkeit bei Frauen durch Umweltgifte. In: Kruse-Jarres, J. D. (Hrsg.): *Prävention, Diagnose und Therapie von Umwelterkrankungen.* 1993, 51-68.
 73. Gerhard I. Akupunktur bei weiblichen Fertilitätsstörungen. *Arch Gynecol Obstet.* 1993;254:566-72.
 74. Lopes EG. Homeopatia aplicada à parasitologia veterinária. In *Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 12 & Simpósio Latino Americano de RICKETSIOSES, L.* Ouro Preto. Anais. Ouro Preto, colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária. 2004;150-155.
 75. Thieffenthaler A. Homeopatia para animais domésticos e de produção. São Paulo: Andrei; 1996. p. 336.
 76. Rajkumar R, Srivastava SK, Yadav MC, Varshney VP, Varshney JP, Kumar H. Effect of homeopathic complex on oestrus induction and hormonal profile in anoestrus cows. *Homeopathy.* 2006;95:131-5.
 77. Kumar H, Srivastava SK, Yadav MC, Varshney JP. Management of postpartum anoestrus in dairy animals with a homeopathic combination remedy. *Indian J Anim Sci.* 2004;74:739-40.
 78. Silva CTL, Mcmannus C, Runpe R. Efeito da *Pulsatilla nigricans* aplicada em um ponto de acupuntura na redução do puerpério bovino. *Homeop Bras.* 2001;7:13-21.