

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL



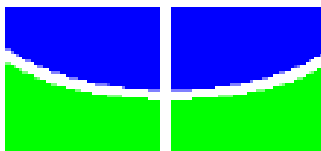
**TÉCNICAS DE IMAGEM NO ESTUDO COMPARATIVO DE OVÁRIOS DE
DIFERENTES ESPÉCIES DOMÉSTICAS**

FERNANDA PAULINI

TESE DE DOUTORADO

BRASÍLIA – DF

2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL



TÉCNICAS DE IMAGEM NO ESTUDO COMPARATIVO DE OVÁRIOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DOMÉSTICAS

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Madeira Lucci

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal

BRASÍLIA-DF

2014

A meus pais,
moldaram meu caráter através
de seus exemplos e de uma base familiar
de amor, companheirismo e amizade
que permitiu meu crescimento
pessoal e profissional.
Sem vocês eu nada seria.

A meu quase marido,
que andou comigo lado a lado,
provendo apoio e conforto necessários
para a realização de mais esta etapa.
Marcelo, seu amor e paciência
têm sido fundamentais.

DEDICO

“Ninguém está orfão de oportunidades. Em toda parte, há serviço a prestar e o melhor a fazer.”

Emmanuel

"Porque qualquer que pede, recebe; e quem busca, acha"
Lucas 11:10

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo e todos, célula eterna de amor e sabedoria. Se cheguei até aqui devo a Ele. N'Ele creio e sei que não tenho nada a temer.

Aos meus mentores e amigos espirituais, que sempre me guiam e me conduzem ao melhor caminho e me auxiliam na jornada de me tornar uma pessoa melhor.

À minha querida orientadora Carolina Madeira Lucci por ter acreditado em mim e ter me proporcionado tantas oportunidades. Por sua dedicação, paciência, disposição e amizade. Levarei para sempre comigo seu exemplo de doçura, profissionalismo e competência em liderar.

Aos membros do grupo ReproUnB, que a convivência tanto me fez crescer. Em especial ao Jivago, Juliana e Victor, que contribuíram para a condução dos inúmeros experimentos e me proporcionaram momentos tão agradáveis, que estarão para sempre nas boas lembranças do doutorado. Obrigada pela amizade, parceria e companheirismo.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, em especial à Prof^a. Dr^a. Sônia Bão, pela infraestrutura disponibilizada para que o trabalho inicial fosse executado e a Ingrid e Marcinha, que sempre facilitaram tudo.

Ao prof. Sacha pela sua imensa generosidade e paciência ao me ensinar a lidar com o microtomógrafo.

Ao prof. Ricardo Bentes de Azevedo, por nos auxiliar no experimento inicial, analisando nossas lâminas de histologia. Obrigada também pela ideia maravilhosa que nos conduziu à finalização!

Ao Dr. Renato do RPMON/ PMDF que nos proporcionou as éguas.

À FACIPLAC, Faculdades Integradas da União Educacional do Planalto Central, por receber nossas éguas e ao prof. Rodrigo de Oliveira França e funcionário Paulo, pela ajuda fundamental na castração e manutenção dos animais.

Ao Dr. Luciano Paulino da Silva, por tanta paciência na condução dos experimentos no segundo projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, pelo auxílio na minha formação profissional, a todo o corpo docente e a secretária Daniele, por conduzir tudo com tanta competência.

À CAPES e ao CNPq, pela bolsa do doutorado.

Aos meus amigos e familiares que sempre vibraram por mim.

Aos meus pais e aos meus sogros, que sempre estiveram ao meu lado, sendo fonte de conforto.

As minhas amigas Gláucia, Anádria, Anailde, Keidna e Ana que souberam fazer da nossa casinha um lugar aconchegante que eu sempre queria estar.

As minhas amigas do Cícero Pereira, que sempre me proporcionaram momentos tão agradáveis e de crescimento pessoal. Sentirei muita falta de nossos cafés!

Ao Marcelo Corrêa da Silva, por fazer parte da minha vida, sendo tão fundamental em cada etapa dela.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
INTRODUÇÃO.....	1
JUSTIFICATIVA.....	3
OBJETIVOS.....	5
CAPÍTULO 1	6
1 INTRODUÇÃO.....	6
2 TÉCNICAS NÃO INVASIVAS	8
2.1 Raio-X.....	8
2.2 Ultrassonografia.....	9
2.2.1 Ultrassonografia em 3D e associada a doppler colorido.....	12
2.3 Ressonância Magnética.....	14
2.4 Tomografia Computadorizada.....	15
3 TÉCNICAS INVASIVAS	18
3.1 Histologia Clássica.....	19
3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	21
4 CONCLUSÕES.....	22
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO 2	47
1 INTRODUÇÃO.....	47
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1 Microtomografia Computadorizada	50
2.2 Histologia.....	50
3 RESULTADOS.....	51
4 DISCUSSÃO	58
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPÍTULO 3	69
1 INTRODUÇÃO.....	69
2 ORIGEM E ESTABELECIMENTO DE FOLÍCULOS OVARIANOS.....	70
3 ESTRUTURA DOS FOLÍCULOS PRIMORDIAIS E ATIVAÇÃO.....	73
4 TRANSIÇÃO DO FOLÍCULO PRIMÁRIO AO FOLÍCULO SECUNDÁRIO.....	79
5 FORMAÇÃO DO ANTRO E MATURAÇÃO OVOCITÁRIA.....	86
6 CONCLUSÃO.....	90
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

3D: três dimensões

µm: micrômetro

ATP: adenosina trifosfato

HE: hematoxilina e eosina

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MicroTC: microtomografia computadorizada

mm: milímetro

MIV: maturação *in vitro*

MHz: mega-hertz

nm: nanômetro

PET: tomografia computadorizada por emissão de pósitrons

RM: ressonância magnética

TC: tomografia computadorizada

US: ultrassonografia

ZP: zona pelúcida

µm: micrômetro

RESUMO

Avanços na pesquisa básica em reprodução animal e nas biotécnicas reprodutivas dependem da perfeita visualização e monitoramento das estruturas ovarianas no desenvolvimento folicular. Assim, o primeiro capítulo desta tese traz uma revisão bibliográfica sobre as principais técnicas utilizadas no estudo e na visualização de estruturas ovarianas, com foco no potencial, na aplicabilidade e nas limitações de cada técnica. O segundo capítulo foi conduzido com um experimento que teve como objetivo comparar as estruturas internas visualizadas no ovário em diferentes espécies por tomografia computadorizada (TC). Foram utilizados ovários de rata, cadela, gata, vaca, porca, égua e jumenta. Os ovários foram escaneados com uso de microtomógrafo computadorizado, e a reconstrução das imagens deu origem a representações bi e tridimensionais dos ovários. As mesmas amostras foram posteriormente processadas para avaliação histológica e validação dos resultados obtidos pelo microTC. A TC possibilitou distinguir as regiões de córtex e medula, observar folículos antrais, identificar os ovócitos dentro deles, visualizar corpos lúteos, bem como a distribuição e morfologia dos vasos sanguíneos de médio e grande calibre, embora não tenha possibilitado a visualização de folículos pré-antrais. Esta técnica apresenta possibilidades para o estudo das estruturas internas do ovário. O terceiro capítulo consiste em uma revisão de literatura que foi motivada pela percepção de que informações sobre a estrutura e ultraestrutura ovariana de diferentes espécies encontram-se dispersas e desassociadas na literatura. Abordando sete espécies domésticas, foram consideradas as principais diferenças na presença e distribuição das organelas citoplasmáticas em ovócitos e células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais. Verificou-se que o padrão ultraestrutural de folículos e ovócitos varia entre espécies domésticas bem como entre as fases do desenvolvimento folicular. Este tipo de conhecimento permite melhorias na compreensão anatômica e fisiológica do ovário, e pode subsidiar avanços em diversas linhas de pesquisa, como na melhoria das biotecnologias reprodutivas e no auxílio da compreensão de danos e pontos limitantes da manipulação *in vitro* de ovócitos em diferentes espécies.

Palavras-chave: desenvolvimento folicular, diagnóstico por imagem, ovócito, tomografia computadorizada, ultraestrutura.

ABSTRACT

Monitoring ovarian structures during follicular development may enable great advances in reproductive biotechnologies and animal reproduction. In this sense, this thesis was divided in three chapters, aiming to empower the understanding of diagnostic imaging, the characterization of ovarian structures and the comparison between domestic species. The first chapter of the thesis is a bibliographic revision considering the main techniques that are useful to visualize the ovarian structures. We focused on the potential, applicability and general limitations of each technique. The second chapter consists of an experiment, undertaken to compare the internal structures of the ovary using computerized microtomography. We compared the ovaries of rats, bitches, quees, cows, mares, sows and female donkey and carried out the reconstruction of the tomographic images to originate two and three dimensional representations. After scanning, the same samples were prepared for histologic evaluation, used in this research as validation criteria for ovary research based on computerized microtomography. Microtomography enabled to distinguish the regions of the cortex and medulla, to identify oocytes, corpus luteum and to visualize the morphology and distribution of medium caliber blood vessels. However, it didn't enable the visualization of pre antral follicles. The third chapter of the thesis is a bibliographic revision motivated by the fact that information comparing the ovarian ultrastructure between species is scarce. We emphasized major differences in seven domestic species, considering the presence and distribution of cytoplasmic organelles in oocytes, granulosa cells, pre antral and antral follicles. It was observed that the ultrastructure of follicles and oocytes vary between species and between the stages of follicular development. This research subsidizes advanced comprehension of the anatomy and physiology of the ovary in different species. It may enable the understanding of several limitations points related to *in vitro* manipulation of oocytes and, therefore, generate future adjustments in reproductive technologies.

Keywords: computerized tomography, diagnostic imaging, follicular development, oocyte, ultrastructure.

INTRODUÇÃO

O aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico por imagem têm possibilitado melhorias na caracterização de estruturas do sistema reprodutivo, com destaque à morfologia ovariana. O estudo do ovário pode ser conduzido mediante técnicas não invasivas e invasivas, sendo fundamental a disponibilidade de imagens de alta resolução, compatíveis com a anatomia e a complexidade das estruturas.

Na pesquisa e na rotina clínica as técnicas de imagem são utilizadas de modo complementar, contudo, muitas vezes, a escolha de uma técnica específica pode diminuir o número de procedimentos requeridos, a velocidade e o custo final para a obtenção de um diagnóstico conclusivo. É necessário compreender como as diferentes técnicas têm auxiliado na caracterização das estruturas ovarianas e na detecção de eventos fisiopatológicos. Do mesmo modo, é necessário identificar tendências e desafios para o futuro próximo.

As técnicas de histologia, imunohistoquímica e ultrassonografia têm auxiliado o estudo e o monitoramento do ovário. A tomografia computadorizada e ressonância magnética têm possibilitado a visualização interna e não invasiva do ovário, sendo promissoras para diagnósticos e estudos de caracterização ovariana. Destaca-se o uso da tomografia computadorizada no diagnóstico de anormalidades ovarianas em humanos e sua discreta contribuição no estudo dos ovários de animais. As modalidades mais modernas e recentes de técnicas de diagnóstico por imagem possibilitam a reconstrução tridimensional (3D) da estrutura ovariana, permitindo a visualização de muitos planos de corte e a

observação em tempo real. Essa é uma característica e vantagem marcante das técnicas computadorizadas e interativas.

Os componentes do ovário, como folículos antrais, pré-antrais e ovócitos, estão sujeitos a inúmeras alterações fisiológicas e celulares, que são importantes para o diagnóstico de anormalidades e para a caracterização ovariana em diferentes espécies. A descrição de alterações morfofisiológicas macroscópicas, microscópicas e ultraestruturais durante o desenvolvimento folicular é necessária para incremento no conhecimento básico da morfologia funcional. Abordagens desta ordem, favorecem também avanços biotecnológicos, considerando o potencial que as biotécnicas da reprodução representam na esfera da conservação e melhoramento genético animal, e no âmbito da fertilidade humana, que dependem da capacidade de compreender a estrutura do ovário, de monitorar os eventos fisiológicos e patológicos e de identificar gargalos nos processos de reprodução assistida.

JUSTIFICATIVA

Na literatura estão descritas inúmeras pesquisas de caracterização morfológica do ovário com uso de diferentes técnicas de imagem. É observado que as técnicas se somam, não havendo uma análise comparativa com o único objetivo de avaliação do ovário. Desta maneira, torna-se importante compilar as informações em um único trabalho de análise comparativa

A quantidade de estudos que reportaram o uso de tomografia computadorizada (TC) na avaliação do ovário em animais é ínfima, embora este tipo de abordagem seja comum em avaliações de neoplasias ovarianas em humanos. Não há na literatura nenhum estudo que tenha utilizado alguma técnica não invasiva para comparar estruturas ovarianas de diferentes espécies. Estudos de caracterização e relatos de caso ao nível ovariano consideram, normalmente, uma única espécie. Portanto, um estudo que vise a avaliação das estruturas ovarianas por TC, em diferentes espécies, é interessante e pode demonstrar um potencial da técnica para auxiliar diagnósticos em animais.

Apesar de existir um grande número de publicações descrevendo alterações ultraestruturais em ovócitos de mamíferos, em especial após algum procedimento biotecnológico, são poucos os estudos que realizaram comparações da ultraestrutura ovariana fisiológica entre espécies animais. Esta informação se encontra dispersa e desassociada na literatura. Desta forma, fazer uma compilação dos dados existentes é importante para se obter uma visão geral e ampla das transformações ultraestruturais, pelas quais as células passam durante o desenvolvimento folicular, ressaltando as diferenças existentes entre as espécies.

Finalmente, os dados apresentados nesta tese podem subsidiar maior assimilação dos potenciais que os equipamentos e técnicas de imagem apresentam, permitindo a escolha adequada de acordo com a finalidade desejada, para uma melhor identificação de patologias e/ou danos celulares causados por técnicas de reprodução assistida.

OBJETIVOS

- Descrever as principais técnicas de imagem utilizadas para a avaliação ovariana em humanos e animais, com foco na aplicação de cada uma delas;
- Comparar a visualização de estruturas ovarianas em diferentes espécies animais com uso de técnica de microtomografia computadorizada;
- Reunir e comparar as alterações ultraestruturais que ocorrem em ovócitos durante o desenvolvimento folicular descritas em diferentes espécies domésticas.

CAPÍTULO 1

PRINCIPAIS TÉCNICAS DE IMAGEM UTILIZADAS PARA A AVALIAÇÃO DOS OVÁRIOS

1 INTRODUÇÃO

O aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico por imagem tem aumentado o poder de visualização de órgãos e microestruturas corporais. Na reprodução humana e animal, estes avanços tem possibilitado melhorias na caracterização morfológica dos ovários. Estudos de caracterização do ovário, e de comparação entre espécies, requerem o uso de imagens de alta resolução, que sejam compatíveis com a estrutura anatômica real e que revelem a complexidade das estruturas presentes. Neste processo, cada técnica apresenta vantagens e limitações.

A opção por uma determinada técnica de imagem pode ser precipitada, quando motivada somente pelo custo operacional do procedimento. Muitas vezes, a adoção do método mais adequado diminui o número de procedimentos requeridos, a velocidade e o custo final para a obtenção de um diagnóstico conclusivo. Contudo, o que é observado na rotina clínica e na pesquisa científica é que as técnicas de imagem fornecem resultados complementares (1;2).

É importante ressaltar que discutir sobre a aplicabilidade de cada técnica de imagem, considerando vantagens e desvantagens, contextualiza um panorama diversificado de especificidades técnicas e preferências individuais. Algumas questões são espécie-específicas, como em casos da impossibilidade de utilizar técnicas invasivas, e outras podem estar relacionadas com a velocidade operacional e praticidade.

A ultrassonografia é uma técnica útil na detecção de tumores ovarianos e no acompanhamento da ciclicidade, mas insuficiente na avaliação de recorrências pós-terapia, distinção entre tipos de neoplasia e diferenciação acurada de algumas estruturas ovarianas (3). A tomografia computadorizada auxilia no monitoramento e diagnóstico de neoplasias, massas anexiais e avaliação das estruturas ovarianas em tratamentos de fertilidade (4), mas é fundamentada na emissão de raio-X, de efeito mutagênico. A ressonância magnética não possui efeito mutagênico e tem as mesmas aplicabilidades da tomografia computadorizada, entretanto o longo procedimento pode prejudicar o contraste e limitar a resolução (5). A histologia clássica, a imunohistoquímica e a microscopia eletrônica de transmissão têm maior resolução e permitem distinguir estruturas subcelulares, entretanto requerem biópsias do tecido ovariano e envolvem processamentos demorados.

Sejam as abordagens invasivas ou não invasivas, micro ou macroscópicas, é necessário compreender as diferenças, vantagens, desvantagens e a dinâmica de utilização de cada método. Nesta revisão pretende-se discorrer acerca das técnicas de imagem mais utilizadas na avaliação de estruturas ovarianas, tanto no âmbito da pesquisa científica como no diagnóstico clínico.

2 TÉCNICAS NÃO INVASIVAS

Algumas técnicas de imagem têm sido utilizadas na avaliação reprodutiva, entre elas a ultrassonografia (US), a tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM), como métodos de avaliação de patologias ovarianas e caracterização dos ovários. Apesar da vantagem inerente da não invasividade, estas técnicas são de menor resolução, mesmo que atualmente algumas delas apresentem dispositivos para a visualização da imagem em três dimensões (3D).

2.1 Raio-X

A primeira técnica de imagem não invasiva utilizada foi o raio-X. Raios-X são radiações eletromagnéticas de pequeno comprimento de onda (entre 0,05 e 0,25nm) que se propagam em linha reta, na mesma velocidade da luz, com poder de atravessar matéria e produzir ionização (6). A visualização de detalhes na imagem é possível devido ao contraste entre as estruturas, o que é ocasionado pela diferença de densidade anatômica do tecido de pelo menos 10% em densidade radiológica (7).

As estruturas radiopacas, como ossos e dentes, têm maior absorção de raio-X. O desenvolvimento e uso de contrastes utilizados via oral, retal e endovenoso, foi importante para melhorar a visualização de diversas estruturas, mas não algumas de interesse reprodutivo (8). Assim, poucas alternativas do raio-X contribuíram ao estudo ovariano, principalmente em função de sobreposições topográficas de estruturas que, nesta técnica, são

resumidas a um único plano radiográfico. No entanto, na rotina clínica, o raio-X tem possibilitado identificar lesões de metástase pulmonar e efusões pleurais, que podem ser consequência de tumor primário ovariano, mas que não caracterizam, necessariamente, o uso desta técnica para a avaliação dos ovários.

2.2 Ultrassonografia (US)

A técnica consiste na utilização de um transdutor que emite e capta sons em alta frequência após serem refletidos na superfície da estrutura de interesse. Assim, o transdutor interpreta os ecos gerados por meio de computação gráfica (9). A capacidade de alcance do ultrassom é inversamente proporcional à frequência de som utilizada, de forma que a resolução aumenta proporcionalmente a frequência (10). A utilização de frequências mais altas é adequada para a visualização de pequenas áreas, permitindo maior detalhe de imagem (11). Na avaliação do aparelho reprodutivo de animais domésticos, transdutores com faixas de frequência de 5,0 a 7,5 MHz são os mais comuns (12), tendo o transdutor de 5 MHz menor resolução de imagem e maior profundidade de alcance do que o de 7,5 MHz (13).

Os órgãos, tecidos, líquidos e gases refletem as ondas ultrassônicas com diferente intensidade. Os ossos refletem o som com alta intensidade, portanto, são visualizados com coloração esbranquiçada na imagem computacional, sendo denominados de estruturas ecogênicas. Os líquidos são visualizados em coloração escura, geralmente preta, em função de serem anecóicos. O tecido e as estruturas do sistema reprodutivo variam quanto a sua ecogenicidade (9).

Nos ovários, os folículos antrais são anecóicos e devem ser diferenciados de vasos sanguíneos (14). Apesar de haver relatos de que a diferenciação entre folículos pré-ovulatórios e corpos lúteos iniciais pode ser dificultada (15-17), essa informação é contraditória na literatura.

No âmbito da evolução das técnicas de imagem a US representou um método revolucionário para a visualização dos ovários e estruturas anexas. Protagonizou a modernização da pesquisa básica e rotina clínica em reprodução humana e animal (18;19). Possibilitou a compreensão de eventos fisiopatológicos e a detecção de massas anexiais no útero, a visualização de cistos ovarianos e tecidos neoplásicos (20-22). Subsidiou estudos com abordagens em biotécnicas da reprodução animal, principalmente na pesquisa da resposta superovulatória mediante tratamento hormonal (23-26).

Kratochwil e colaboradores (27) foram os primeiros a descrever os ovários de humanos por meio de US transvaginal. Pela eficiência do método, revelada a partir deste primeiro relato, diversos autores utilizaram o ultrassom na descrição de ovários de diversas espécies domésticas (para detalhes veja 28). Com isso, foi possível a identificação de corpos lúteos logo após a ovulação (29;30), o acompanhamento do desenvolvimento folicular e a descrição de cistos foliculares e luteais mediante método não invasivo e *in vivo* (30-34).

Sassone e colaboradores (35) revelaram a sensibilidade da técnica transvaginal na detecção de tecido neoplásico. Em 100% dos ovários humanos analisados, os autores puderam identificar tumorações, sendo possível distinguir tumores malignos de benignos em 83% dos casos. Entretanto a técnica transvaginal é limitada na avaliação de tumores recorrentes, pois muitas vezes o tecido neoplásico encontra-se difuso no peritônio abdominal e

pélvico (3). Ressalta-se que esta via não pode ser utilizada em todas as espécies, nem em mulheres que apresentam integridade himenal (36). Todavia, esta modalidade permitiu o diagnóstico bastante precoce da gestação, compreensão em casos de infertilidade, o monitoramento do desenvolvimento embrionário e a sexagem fetal (12;34;37;38).

A limitação do método transabdominal para a visualização dos ovários e estruturas da região pélvica é dificultada pela presença de gases intestinais e tecido adiposo (22). As vantagens da US estão relacionadas ao fato de ser uma técnica não invasiva, ou semi-invasiva, que pode ser realizada com equipamento portátil, oferecendo boa resolução, avaliação da imagem em tempo real, com um custo relativamente baixo e sem riscos mutagênicos (38). Ela pode servir como guia no uso de outras técnicas, como punção folicular e obtenção de biópsias dirigidas.

Um dos principais pontos limitantes da US é o fenômeno de “ruído”, definido como *Speckle*, que prejudica a resolução da imagem e tem requerido a utilização de filtros (39). Em casos de baixa fertilidade a avaliação por US é limitada pela necessidade de maior detalhe acerca do interior do ovário com alta definição (40), como em estimativas de população folicular, de folículos pré-ovulatórios e corpos lúteos e para diferenciar massas benignas de malignas (16; 41-44). Essas limitações não dependem da via de acesso nem do modelo do transdutor utilizado, o que caracteriza um impasse no uso da US para a avaliação do ovário.

2.2.1 Ultrassonografia em 3D e associada a doppler colorido

Alguns pontos limitantes da US no estudo do ovário foram sanados com avanços na qualidade da imagem. Uma inovação marcante foi o ultrassom em 3D, baseado na utilização de um transdutor para identificar, caracterizar e posicionar os folículos antrais (45-47). Embora denominada 3D, assim como na US convencional, esta técnica retrata apenas a superfície do ovário num plano bidimensional. É após a modelagem computacional que este novo método permite a ilustração do ovário em 3D (para detalhes veja 48).

Imagens tridimensionais do ovário de mulheres, obtidas mediante US transabdominal, foram consideradas equivalentes às imagens transvaginais obtidas com o ultrassom convencional (49;50). Já na avaliação de folículos antrais, comparando-se ambas as técnicas, via transvaginal, o método em 3D apresentou superioridade (51) com discreta vantagem na contagem de folículos (52), vantagem esta que não foi observada por Brett (53).

Outra importante variação da técnica de ultrassom na reprodução humana e animal é a US associada ao doppler colorido (54). O fenômeno doppler é caracterizado pela mudança na frequência de som de estruturas em movimento, percebida por um dispositivo imóvel. A técnica possibilita detectar turbulências dentro de vasos sanguíneos, representadas por diferentes intensidades e direção de fluxos em pequenos vasos da circulação útero-ovárica. Além disso, permite mensurar o grau de impedimento de fluxo na rede vascular, sendo útil no diagnóstico de eventos fisiopatológicos (34).

O doppler colorido tem sido utilizado na investigação da vascularização dos folículos antes e durante a aquisição da competência ovocitária, e também

no processo de ovulação (55-58). Outra aplicação tem sido na identificação de massas tumorais benignas e malignas, tendo como parâmetro o fato dos tumores malignos serem, geralmente, mais vascularizados (19;59;60). No entanto, há casos que a diferenciação entre tumores benignos de malignos é dificultada, mesmo com o uso do doppler (61;62). Além disso, a US associada a doppler permite também a identificação de massas inflamatórias, cistos endometriais, cistos luteais e gravidez ectópica (1), o que é baseado em dados de pulsatilidade e resistência ao fluxo sanguíneo.

Considerando todas as modalidades das técnicas de imagem ultrassonográficas, o ultrassom é importante e útil na avaliação do ovário e no diagnóstico de patologias ovarianas e eventos fisiológicos. Contudo, mesmo com ajustes na tecnologia, existe ainda uma limitação marcante, representada pela impossibilidade de visualizar o interior do ovário com alta resolução. Esta abordagem requer técnicas de imagem alternativas, que possam suprir demandas como de estimativas da população folicular, detecção de tecidos atípicos como fibroses e necroses, identificação de pequenos cistos luteínicos, determinação do tipo do tecido neoplásico e estadiamento, eventos degenerativos, danos causados por terapias gonadotóxicas e a compreensão de mecanismos que ocorrem dentro de folículos e do corpo lúteo (57;63-65). Apesar disso, a US é a técnica de imagem mais utilizada para a avaliação do ovário, tendo um custo geralmente reduzido quando comparado a técnicas de imagens com maior poder de resolução (66).

2.3 Ressonância Magnética

A ressonância magnética (RM) foi desenvolvida a partir da década de 1970 e teve difusão mais acentuada quando foram possíveis melhorias na resolução da imagem, na velocidade de processamento e na facilidade de aquisição de aplicativos de análise. O método permite a visualização direta de tecidos biológicos, com ótima resolução anatômica e espacial.

Apesar de inicialmente ter sido denominada ressonância magnética nuclear, a RM não utiliza radioatividade ionizante, a exemplo do raio-X. O princípio está na utilização de um forte campo magnético associado a uma bobina de radiofrequência emissora de sinais sonoros (67). A submissão de tecidos biológicos ao campo magnético, provoca a orientação dos núcleos de hidrogênio celular, que vibram em torno do próprio eixo, emitem energia, e possibilitam a geração de imagens dos tecidos e estruturas corporais (68).

Na avaliação da pelve feminina, a RM possibilita a visualização do útero e ovários, a diferenciação de tumores e fibroses, a detecção de anomalias congênitas, teratomas, miomas e cistos endometriais, sendo útil em estudos de infertilidade (5;69-71).

A RM possui alta sensibilidade para descrever massas anexiais malignas (71-79), fibromas (80-83) e torções ovarianas (84-86). Foi verificado que a RM possui sensibilidade de 85-95% em diagnósticos de tumores ovarianos (72;73;87), sendo esta técnica melhor e mais precisa na definição e no diagnóstico diferencial de tumores malignos e benignos (1;5;73;74;77;88-96). Entretanto não é um método apropriado para detecção de massas tumorais pós-cirúrgicas recorrentes (79).

O uso de contrastes facilita o diagnóstico do tipo do tumor e/ou a classificação do cisto visualizado. Quando utilizado via endovenosa permite ainda a análise de massas anexiais e a quantificação de lesões não identificadas sem contraste, melhorando a qualidade de diagnósticos patológicos (78). Contudo, parece existir controvérsia quanto à possibilidade de visualizar pontos de fixação de tumores no peritônio e mesentério, próximos ao ovário, com o uso de contrastes (5;97). O contraste de bário foi indicado como sendo o mais vantajoso (79), mas o uso de gadolínio também apresentou bons resultados (74;98;99).

Em humanos, a RM é muito utilizada quando a US apresenta resultados inconclusivos (100;101). Apesar das inúmeras vantagens, o custo elevado dos equipamentos de RM, somado ao tempo requerido para o procedimento, tem limitado a maior difusão desta técnica no estudo ovariano (102).

2.4 Tomografia Computadorizada

A técnica de tomografia computadorizada (TC) consiste na emissão de radiação ionizante (raio-X) em um tubo de alta potência acoplado a computadores. A radiação é emitida ao mesmo tempo em que ocorre o movimento circular dos tubos, originando um feixe em forma de leque ao redor do organismo analisado (103). No lado oposto à fonte emissora, uma série de detectores transformam o sinal de radiação em sinal elétrico, originando imagens digitais de alta resolução (104).

A TC passou a ser mais difundida com avanços graduais na resolução da imagem, sendo possível obter resoluções melhores do que 50 μ m (105). As

imagens correspondem a secções virtuais, permitindo a reconstrução em 3D dos tecidos e estruturas de interesse (106). A TC helicoidal e TC por multidetectores são algumas das inovações da técnica de TC que possibilitaram melhores resoluções de imagem e emissões mais brandas de radiação (107;108). Além destas duas, a TC por emissão de pósitrons (PET) permite a avaliação de taxas metabólicas do organismo (109). A técnica de microtomografia computadorizada (microTC) é outra modalidade de TC, mais comumente utilizada na pesquisa. O equipamento da microTC é bem menor, o que restringe seu uso a animais de laboratório ou amostras menores, mas possui poder de resolução semelhante ou maior que a TC(110), que viabiliza a análise em nível tecidual e celular, a descrição morfológica espacial de órgãos e as relações entre unidades funcionais (111), assim como a TC.

Estudos têm demonstrado que é possível avaliar qualquer tipo de amostra biológica *in vivo* com uso da TC (112;113). A técnica apresenta dispositivos para a caracterização de ossos (114-121) ou arquitetura vascular (122-127); olhos (128-132), miocárdio (133), trato gastrointestinal (134-139), pulmões, rins, fígado, estruturas cerebrais (133;134;140;141) e a monitoração do desenvolvimento embrionário (110;142). Permite também a identificação de pequenas áreas de necrose (143) e a detecção de alterações de colágeno, o que muitas vezes sugere o desenvolvimento de tecido neoplásico maligno (143;144). É possível com a TC identificar tumores e as regiões de vascularização (126;145-147), bem como medir o volume de estruturas (148-150), distâncias, deslocamentos, diâmetros e espessuras por meio de gráficos computacionais interativos que facilitam a visualização de relações espaciais entre estruturas (113;145;150-153).

Ressalta-se que a TC permite vincular a imagem anatômica com imagens funcional e molecular, como a taxa de fluxo de secreções exócrinas dentro de órgãos parenquimatosos e glândulas (154). Contudo, para a avaliação de tecidos moles e vasos sanguíneos, pode ser necessária a utilização de contrastes endovenosos, sendo os meios de contraste iodados os mais utilizados (153;155-157). Assim, o uso de contrastes, a exemplo da técnica de RM, tem possibilitado o diagnóstico de pequenas lesões extraovarianas e a distinção entre tumores ovarianos e lesões anexiais, situadas principalmente no peritônio (77;78;89;158-163).

Com relação à estrutura ovariana, a TC tem sido utilizada como instrumento de caracterização morfológica e funcional (89;143;151;152;157;164-168). Tem possibilitado a visualização de folículos antrais em diferentes estágios de desenvolvimento, corpos lúteos, cistos e angiogênese ovariana (89;155;167-170), além do diagnóstico de torção ovariana (84).

Em se tratando de câncer ovariano, a TC tem permitido, muitas vezes, a estimativa do volume e a classificação do tipo do tumor (1;4;74;77;87-90;143;144;152;163;167;171-180). Assim, a técnica tem auxiliado o monitoramento de tratamentos em casos de neoplasia ovariana (151;173;181), com alguns relatos de visualização limitada do ovário em pacientes pediátricos (182).

Nos últimos anos, estudos têm revelado vantagens e desvantagens do uso da TC em comparação a outras técnicas de imagem não invasivas. As vantagens estão normalmente relacionadas com a maior velocidade na obtenção da imagem, com a emissão mais atenuada de radiação comparado

com a técnica de raio-X convencional e a alta precisão da técnica (7;153;180). Há relatos de que a imagem adquirida com a TC é menos propensa a distorção e artefatos em relação à ressonância magnética (102). Outro destaque é a pequena interferência da sobreposição de ossos, fezes e gases na visualização de estruturas situadas na pelve, como os ovários (157).

O custo do equipamento e dos procedimentos para a captação de imagem são fatores que limitam a maior difusão da TC. O grande volume de dados requer recurso humano especializado para lidar com o processamento das informações. Este tipo de capacitação e familiaridade com a técnica é essencial na prevenção de erros de diagnóstico (177;183). Com isso, o padrão ouro da técnica de TC consiste em validar os achados tomográficos por meio da histologia clássica (177;184;185), garantindo excelência e qualidade no diagnóstico emitido. Atualmente, o uso da TC tem sido amplo nas áreas de medicina veterinária, zoologia, biomedicina, odontologia e farmácia (186), sendo mais difundida e mais impactante no diagnóstico médico.

3 TÉCNICAS INVASIVAS

As técnicas mais acuradas para a avaliação da morfologia do tecido e estruturas ovarianas, envolvem cortes para a visualização de secções reais do tecido. Assim, há necessidade da retirada de um fragmento por biópsia, o que inviabiliza sua utilização após o diagnóstico. Além disso há o risco de que o tecido biopsiado pode não refletir o estado geral do órgão como um todo.

3.1 Histologia Clássica

A técnica de histologia tem auxiliado a reprodução assistida em humanos e animais, possibilitando a análise do tecido ovariano com detalhes celulares. Entretanto, por ter caráter invasivo, há necessidade de realização de laparotomia, laparoscopia e/ou biópsia, seguida da fixação imediata do tecido amostrado. Este procedimento inibe a autólise tecidual, possibilita a preservação dos componentes celulares, melhor coloração e visualização das diferentes estruturas (187).

A histologia tem subsidiado a detecção de alterações morfológicas do tecido ovariano, comuns em tratamentos gonadotóxicos (188), a visualização e morfometria de folículos em diversas fases de desenvolvimento, incluindo folículos pré-antrais, e a estimativa da população folicular em diversas espécies animais e humanos (189-223).

Em casos de suspeita de câncer ovariano a biópsia é realizada para confirmação histológica de neoplasia e diagnóstico diferencial de endometriose e cistos ovarianos (102;180;224-228). Além de confirmar a presença de tecido neoplásico, a histologia é a única técnica que permite classificar o tipo de tumor ovariano (22;229-241). Entretanto, no caso de biópsias ovarianas, existe o risco de falso-negativos, pois, geralmente, somente uma pequena porcentagem do órgão é retirada para a biópsia, que pode não corresponder ao tecido lesionado (242). Além disso, há casos em que a histologia é limitada para a classificação de tumores, visto que estes podem apresentar padrões histológicos difusos (243).

A histologia tem contribuído ainda para a avaliação de biotecnologias, como o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e tecido ovariano, permitindo a observação da integridade do ovócito e das células da granulosa (244-256).

Além disso, a histologia tem auxiliado também na avaliação da eficiência da criopreservação de tecido ovariano (250;253-277). A integridade das organelas não pode ser visualizada com uso da histologia, sendo necessário uma técnica com maior poder de resolução.

As técnicas clássicas de histopatologia apresentam-se ainda mais precisas quando aliadas à imunohistoquímica, considerado um método de identificação de estruturas teciduais e celulares específicas e que geralmente está associado à confirmação de patologias ou suas consequências funcionais (278-280). Assim a aplicação desta técnica necessita do conhecimento de marcadores ovarianos específicos (281), que para tumores ovarianos já estão bem estabelecidos (239;281-286).

Deste modo, em pesquisas na área reprodutiva, a imunohistoquímica vem sendo utilizada na constatação de tumores ovarianos (230;286-296) e na caracterização e desenvolvimento folicular, utilizando marcadores de proliferação celular, de receptores hormonais e da secreção de substâncias (213;214;216;217;222;223;297-318). As técnicas de histologia e imunohistoquímica tem sido de grande importância na avaliação de ovários, pois geram diagnósticos conclusivos. Contudo, são técnicas invasivas e envolvem procedimentos demorados e trabalhosos.

3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica que consiste na emissão de feixes de elétrons em direção a uma amostra ultrafina de tecido. A imagem é resultado da interação entre o feixe de elétrons com a amostra, sendo a imagem capturada e processada por meio de um sistema computacional (319). Com poder de resolução de 0,1nm, a MET possibilita a identificação de alterações ultraestruturais de organelas celulares (319). Esta característica tem sido uma justificativa importante para a inclusão desta técnica na caracterização do desenvolvimento folicular e ovocitário. Diversos trabalhos de fato tem sido realizados no sentido de elucidar as alterações ultraestruturais que ocorrem no ovócito e células foliculares em todas as etapas da foliculogênese (218;219;297;320-345). Estes estudos possibilitam o conhecimento básico da biologia e dos processos biológicos da reprodução humana e animal com melhor poder de resolução que a histologia.

A abordagem ultraestrutural tem sido de extrema importância no estudo ovariano, permitindo identificar e caracterizar lesões como tumores (287;346-352) e lesões acarretadas por terapias gonadotóxicas, como a quimioterapia (353-355).

Além disso, possibilita avaliar a eficiência de técnicas como a criopreservação, tendo como parâmetro a ultraestrutura de folículos e ovócitos (265-267;270;274;356-372). Assim, considerando que várias etapas do procedimento de criopreservação podem acarretar lesões no tecido ovariano, o uso da MET, muitas vezes, está associada a melhorias nos protocolos desenvolvidos. A mesma situação ocorre no aprimoramento do cultivo *in vitro*,

no qual a MET subsidia a avaliação da eficiência do cultivo *in vitro* de tecido ovariano e folículos pré-antrais (366;373-381).

Entretanto, as principais limitações no uso desta ferramenta são o tempo de execução, a onerosidade e a possibilidade de avaliação de apenas um número limitado de amostras.

4 CONCLUSÕES

O ultrassom é a técnica de imagem não invasiva mais utilizada para a visualização de ovários. No entanto, pouco contribui na observação do interior do ovário, mesmo após inovações com uso de doppler e imagens 3D. A RM tem sido utilizada na identificação e diferenciação de tumores e, embora tenha melhor resolução que o ultrassom, também é limitada para avaliar a recorrência de tumores ovarianos após tratamento terapêutico ou cirúrgico. A TC tem a vantagem de permitir verificar este tipo de recorrência pós-terapia. A RM e a TC tem possibilitado a visualização das relações espaciais implícitas, principalmente com o uso de contrastes. Ainda não há relatos da visualização de folículos pré-antrais com uso de técnicas não invasivas. A histologia tem possibilitado a caracterização de estruturas ovarianas e o diagnóstico patológico e diferencial, principalmente quando aliada à imunohistoquímica. O uso da MET é um avanço no estudo ovariano, permitindo a avaliação ultraestrutural.

Muitas vezes é necessário comparar resultados obtidos com diferentes técnicas de imagem. Essa interação entre técnicas é evidente na literatura e importante para a caracterização ovariana e para os diagnósticos patológicos.

Um desafio é eleger a técnica mais adequada para cada caso, com base na velocidade, qualidade e custo da obtenção de um diagnóstico final.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TOGASHI, K. Ovarian cancer: the clinical role of US, CT, and MRI. *European Radiology*, v. 13, n. 4, p. L87-L104, 2003.
2. HANDSCHUH, S.; BAEUMLER, N.; SCHWAHA, T.; RUTHENSTEINER, B. A correlative approach for combining microCT, light and transmission electron microscopy in a single 3D scenario. *Frontiers in Zoology*, v. 10, p. 44-62, 2013.
3. SUGIYAMA, T.; NISHIDA, T.; KOMAI, K.; NISHIMURA, H.; YAKUSHIJI, M.; NISHIMURA, H. Comparison of CA125 assays with abdominopelvic computed tomography and transvaginal ultrasound in monitoring of ovarian cancer. *International Journal of Gynaecology & Obstetrics*, v. 54, p. 251–256, 1999.
4. MAKHIJA, S.; HOWDEN, N.; EDWARDS, R.; KELLEY, J.; TOWNSEND, D. W.; MELTZER, C. C. Positron Emission tomography/computed tomography imaging for the detection of recurrent ovarian and fallopian tube carcinoma: A Retrospective Review. *Gynecologic Oncology*, v. 85, p. 53–58, 2002.
5. FORSTNER, R.; HRICAK, H.; POWELL, C. B.; AZIZI, L.; FRANKEL, S. B.; STERN, J. L. Ovarian cancer recurrence: value of MR imaging. *Radiology*, v. 196, n. 3, p. 715-720, 1995.
6. FREITAS, L. O.; NACIF, M. S. *Radiologia prática para o estudante de medicina*. 1.ed. Revinter: Rio de Janeiro, 2001, 191p.
7. BONTRAGER, K. L. *Tratado de técnica radiológica e base anatômica*. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, 2003, 805p.
8. SANTOS, A. P.; GAIVÃO, A. M.; TAVARES, A.; FERREIRA, S. Produtos de contraste iodados, *Acta Medica Portuguesa*, v. 22, n. 3, p. 261-274, 2009.
9. RANTANEN, N. W.; EWING, R. L. Principles of ultrasound application in animals. *Ultrasound Application in Animals*, v. 22, n. 5, p. 196-203, 1981.
10. DYSON, S. Selecting a machine for diagnostic ultrasound examinations in horses. *Equine Veterinary Education*, v. 3, p. 161-5, 1991.
11. MOURA, J.C.A.; MERKT, H. *A ultrassonografia na reprodução equina*. 2ed. Editora Universitária Americana: Salvador, 1996, 162p.
12. FRICKE, P.M.; LAMB, G. C. Potential applications and pitfalls of reproductive ultrasonography in bovine practice. *Veterinary Clinics Food Animal*, v. 21, p. 419-436, 2005.
13. STROUD, B. The use of ultrasound in cow/calf applications. *American Association of Bovine Practitioners Proceedings*. v. 39, p. 3-7, 2006.
14. OMRAN, S. N.; AYLIFFE, T. R.; BOYD, J. S. Preliminary observations of bovine ovarian structures using B-mode real-time ultrasound. *Veterinary Record*, v. 112, p. 465–466, 1988.
15. WALLACE, S. S.; MAHAFFEY, M. B.; MILLER, D. M.; THOMPSON, F. N.; CHAKRABORTY, P. K. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *American Journal of Veterinary Research*, v. 53, p. 209–15, 1992.
16. SILVA, L. D. M.; ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. P. Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v. 37, p. 313–320, 1996.
17. EKER, K.; SALMANOGLU, M. R. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and CL formation in a bitch. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Science*, v. 30, p. 589–592, 2006.
18. HERMAN, J. D.; APPELBAUM, H. Hereditary breast and ovarian cancer syndrome and issues in pediatric and adolescent practice. *Journal of Pediatric & Adolescent Gynecology*, v. 23, p. 253-258, 2010.
19. PORRATA, L. M. P.; GOMEZ, O. G.; CRUZATA, A. S.; NAVARRO, M. M. M.; FERNÁNDEZ, C. M. G. Ovarian tumors: pathogenesis, clinical pattern, echographic and histopathological diagnosis. *Medisan*, v. 6, n. 6, p. 920, 2012

20. PRATER, P. E.; SHIRES, M.; COLEY, R. B. Diagnostic aids for ovarian neoplasia: serologic interpretation and ultrasonography. *Veterinary Medicine*, v. 83, p. 1273–1276, 1988.
21. KAHN, W.; LUDLOW, W. *Characteristics of pathological conditions of the bovine uterus and ovaries*. In: Diagnostic Ultrasound and Animal Reproduction. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1989, p. 53–65.
22. SHAABAN, A.; REZVANI, M. Ovarian cancer: detection and radiologic staging. *Clinical Obstetrics And Gynecology*, v. 52, n. 1, p. 73–93, 2009
23. MACIEL, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; GUSTAFSSON, H. Fine structure of corpora lutea in superovulated heifers. *Journal of Veterinary Medicine Series*, v. 39, p. 89–97, 1992.
24. ROBERTSON, L.; CATTONI, J. C.; SHAND, R. I.; JEFFCOATE, I. A. A critical evaluation of ultrasonic monitoring of superovulation in cattle. *British Veterinary Journal*, v. 149, p. 477–484, 1993.
25. SUZUKI, T.; YAMAMOTO, M.; OE, M.; TAKAGI, M. Superovulation of beef cows and heifers with a single injection of FSH diluted in polyvinylpyrrolidone. *Veterinary Record*, v. 135, p. 41–42, 1994.
26. KOHRAM, H.; TWAGIRAMUNGU, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J.; GUILBAULT, L. A. Ovarian superstimulation and follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. *Theriogenology*, v. 49, p. 1175–1186, 1998.
27. KRATOCHWIL, A.; URBAN, G.; FRIDRICH, G. Ultrasonic tomography of the ovary. *Annales Chirurgiae et Gynaecologiae Fenniae*, v. 61, p. 211–214, 1972.
28. EVANS, A. C. O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals *Reproduction in Domestic Animals*, v. 38, n. 4, p. 240–246, 2003.
29. PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detection of the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*, v. 28, p. 929–936, 1987.
30. RIBADU, A. Y.; WARD, W. R.; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. *Veterinary Record*, v. 135, p. 452–457, 1994.
31. EDMONDSON, A. J.; FISSORE, R. A.; PASHEN, R. L.; BONDURANT, R. H. The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract I. Normal and pathological ovarian structures. *Animal Reproduction Science*, v. 12, p. 157–165, 1986.
32. FARIN, P. W.; YOUNGQUIST, R. S.; PARFET, J. R.; GAVERICK, H. A. Diagnosis of luteal and follicular ovarian cysts in dairy cows by sector scan ultrasonography. *Theriogenology*, v. 34, p. 633–642, 1990.
33. SAWAMUKAI, Y.; SAITOH, M.; NAKAO, T.; KAWATA, K. Ovarian ultrasonographs, milk progesterone profiles, hCG treatment and sexual behaviour for better diagnosis of ovarian follicular cysts in cows. *Journal of Animal Reproduction*, v. 37, p. 167–175, 1991.
34. RIBADU, A.Y.; NAKAO, T. Bovine reproductive ultrasonography: a review. *Journal of Reproduction and Development*, v. 45, p. 13–28, 1999.
35. SASSONE, A. M.; TIMOR-TRITSCH, I. E.; ARTNER, A.; WESTHOFF, C.; WARREN, W. B. Transvaginal sonographic characterization of ovarian disease: evaluation of a new scoring system to predict ovarian malignancy. *Obstetrics & Gynecology*, v. 78, p. 70–76, 1991.
36. DEWAILLY, D.; CATTEAU-JONARD, S.; PONCELET, E. Which morphological investigations and how to interpret them to make the diagnosis of PCOS. *Annales d'Endocrinologie*, v. 71, 3, p. 183–188, 2010.
37. BEAL, W.E.; PERRY, R. C.; CORAH, L. R. The use of ultrasound in monitoring reproductive physiology of beef cattle. *Journal of Animal Science*, v. 70, p. 924–929, 1992.
38. JONES, A. L.; BEAL, W. E. Reproductive Applications of ultrasounds in the cow. *Bovine Practitioner*, v. 37, p. 1, 2003.

39. SARANYA, R.; MAHESWARI, S. U. A literature review on computer assisted detection of follicles in ultrasound images of ovary. *International Journal of Computer Applications*, v. 48, n.12, 2012.
40. SHMORGUN, D.; HUGHES, E.; MOHIDE, P, ROBERTS, R. Prospective cohort study of three- versus two-dimensional ultrasound for prediction of oocyte maturity. *Fertility and Sterility*, v. 93, n.4, p.1333-1337, 2010.
41. WILDT, D. E.; LEVINSON, C. J.; SEAGER, S. W. J. Laparoscopic exposure and sequential observation of the ovary of the cycling bitch. *Anatomical Record*, v. 189, p. 443–50, 1977.
42. WILDT, D. E.; CHAKRABORTY, P. K.; PANKO, W. B.; SEAGER, W. J. Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biology Reproduction*, v. 8, p. 561–570, 1978.
43. HIREMATH, P. S.; TEGNOOR, J. R. Automatic detection of follicles in ultrasound images of ovaries, India. In: International conference on Cognition and Recognition, 2008, Mysore, India. *Proceedings...Mysore, India*, p. 468-473.
44. HIREMATH, P. S.; AKKASALIGER, P.; BADIGER, S. Performance comparison of wavelet transform and contourlet transform based method for despeckling medical ultrasound images. *IJCA- The International Journal of Advanced Computing*, v.26, n.9, p. 34-41, 2011.
45. SCHEFFER, G. J.; BROEKMANS, F. J.; BANCSI, L. F.; HABBEMA, J. D.; LOOMAN, C. W.; TE VELDE, E. R. Quantitative transvaginal two- and three-dimensional sonography of the ovaries: reproducibility of antral follicle counts. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 20, n. 3, p. 270-275, 2002.
46. BENACERRAF, B. R.; BENSON, C. B.; ABUHAMAD, A. Z.; COPEL, J. A.; ABRAMOWICZ, J. S.; DEVORE, G. R.; DOUBILET, P. M.; LEE, W.; LEV-TOAFF, A. S.; MERZ, E.; NELSON, T. R.; O'NEILL, M. J.; PARSONS, A. K.; PLATT, L. D.; PRETORIUS, D. H.; TIMOR-TRITSCH, I. E. Three- and four-dimensional ultrasound in obstetrics and gynecology: proceedings of the American Institute of ultrasound in medicine consensus conference. *Journal of Ultrasound in Medicine*, v. 24, p. 1587-1597, 2005.
47. HAADSMA, M. L.; BUKMAN, A.; GROEN, H.; ROELOFFZEN, E. M.; GROENEWOUD, E. R.; HEINEMAN, M. J.; HOEK, A. The number of small antral follicles (2-6mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Human Reproduction*, v. 22, p. 1925-1931, 2007.
48. HAOUA, Z.; JAYAPRAKASAN, K.; FENNING, N. P. Assessment of ovarian function by 3D ultrasound. *RAD Magazine*, v. 37, n. 430, p. 13-14, 2011.
49. MAYMON, R.; HERMAN, A.; ARIELY, S.; DREAZEN, E.; BUCKOVSKY, I.; WEINRAUB, Z. Three-dimensional vaginal sonography in obstetrics and gynaecology. *Human Reproduction Update*, v. 6, n. 5, p. 475-484, 2000.
50. STUPARU-CRETU, M.; NECHITA, A. Ovarian ultrasound imaging for polycystic ovary syndrome in adolescents -types of approach. *Analele Universitatii Dunarea de jos Galati Medicina*, v. XVII, n. 1, p. 127-132, 2013.
51. LAM, P.; RAINE-FENNING, N.; CHEUNG, L.; HAINES, C. Three-dimensional ultrasound features of the polycystic ovary in Chinese women. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 34, n. 2, p. 196-200, 2009.
52. JAYAPRAKASAN, K.; HILWAH, N.; KENDALL, N. R.; HOPKISSON, J. F.; CAMPBELL, B. K.; JOHNSON, I. R.; RAINE-FENNING, N. J. Does 3D ultrasound offer any advantage in the pretreatment assessment of ovarian reserve and prediction of outcome after assisted reproduction treatment? *Human Reproduction*, v. 22, n. 7, p. 1932–1941, 2007.
53. BRETT, S.; BEE, N.; WALLACE, W. H.; RAJKHOWA, M.; KELSEY, T. W. Individual ovarian volumes obtained from 2-dimensional and 3-dimensional ultrasound lack precision. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 18, n. 3, p. 348-351, 2009.

54. STROUD, B. K. Clinical applications of bovine reproductive ultrasonography. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v. 16, p.1085–1097, 1994.
55. GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 24, p. 516–526, 2004.
56. OTTANDER, U.; SOLENSTEN, N.; BERGH, A.; OLOFSSON, J. I. Intraovarian blood flow measured with color Doppler ultrasonography inversely correlates with vascular density in the human corpus luteum of the menstrual cycle. *Fertility and Sterility*, v. 81, p. 154–159, 2004.
57. ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. *Journal of Reproduction and Development*, v. 51, p. 273–280, 2005.
58. TERAZONO, T.; INOUE, M.; KAEDEIA, Y.; TANIHARA, F.; NAMULA, Z.; VIET, V. L.; TAURA, Y.; TAKAGI, M.; OTOI, T. Assessment of canine ovaries autografted to various body sites. *Theriogenology*, v. 77, p. 131–138, 2012.
59. SALEM, S.; WHITE, L. M.; LAI, J. Doppler sonography of adnexal masses: the predictive value of the pulsatility index in benign and malignant disease. *American Journal of Roentgenology*, v.163, p. 1147–1150, 1994.
60. WOODWARD, E. R.; SLEIGHTHOLME, H. V.; CONSIDINE, A. M.; WILLIAMSON, S.; MCHUGO, J. M.; CRUGERD, D. G. Annual surveillance by CA125 and transvaginal ultrasound for ovarian cancer in both high-risk and population-risk women is ineffective. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 114, p.1500-1509, 2007.
61. HAMPER, U. M.; SHETH, S.; ABBAS, F. M.; ROSENSHEIN, N. B.; ARONSON, D.; KURMAN, R. J. Transvaginal color Doppler sonography of adnexal masses: differences in blood flow impedance in benign and malignant lesions. *American Journal of Roentgenology*, v. 160, p. 1225–1228, 1993.
62. PEREZ-RAMIREZ, M.; FERNANDEZ- FERNANDEZ, I.; MULET-MATOS, E. Principales aplicaciones del Doppler color transvaginal. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, v. 23, n. 2-3, p. 75-80, 1997.
63. HUERTAS, M. A.; UGUET, C.; ROMO, A.; BAJO-ARENAS, J. M. *Estudio ultrasonográfico de las formaciones orgánicas del ovario. Cáncer de ovario. Score ecográfico. Valoración Doppler.* In: Ultrasonografía ginecológica. Editorial Marban: Madrid; 2005, p.141-72.
64. SIDDIQUI, M, A.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O. J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 113, p. 287–292, 2009.
65. GINTHER, O. J.; RAKESH, H. B.; HOFFMAN, M. M. Blood flow to follicles and CL during development of the periovulatory follicular wave in heifers. *Theriogenology*, in press, 2014.
66. SEVERI, F. M.; BOCCHI, C.; VANNUCCINI, S.; PETRAGLIA, F. Ovary and ultrasound: from physiology to disease. *Archives of Perinatal Medicine*, v. 18, n.1, p. 7-19, 2012.
67. MAZZOLA, A. A.; Magnetic resonance: principles of imageformation and applications in funcional imaging. *Revista Brasileira de Física Médica*, v. 3, n. 1, p. 117-129, 2009.
68. MADUREIRA, L. C. A.; OLIVEIRA, C. S.; SEIXAS, C.; DE NARDI, V.; ARAÚJO, R. P. C.; ALVES, C. The importance of magnetic resonance image in studies about interactive processes of organs and systems. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 9, n. 1, p. 13-19, 2010.
69. EBNER, F.; KRESSEL, H. Y.; MINTZ, M. C.; CARLSON, J. A.; COHEN, E. K.; SCHIEBLER, M.; GEFTER, W.; AXEL, L. Tumor recurrence versus fibrosis in the female pelvis: differentiation with MR imaging at 1.5 T. *Radiology*, v. 166, p, 333-340, 1988.

70. SUGIMURA, K.; CARRINGTON, B. M.; QUIVEY, J. M.; HIRCAK, H. Postirradiation changes in the pelvis: assessment with MR imaging. *Radiology*, v. 175, p. 805-813, 1990.
71. HRICAK, H.; CHEN, M.; COAKLEY, F. V.; KINKEL, K.; YU, K. K.; SICA, G.; BACCHETTI, P.; POWELL, C. B. Complex adnexal masses: detection and characterization with MR imaging—multivariate analysis. *Radiology*, v. 214, p. 39–46, 2000.
72. YAMASHITA, Y.; TORASHIMA, M.; HATANAKA, Y.; HARADA, M.; HIGASHIDA, Y.; TAKAHASHI, M.; MIZUTANI, H.; TASHIRO, H.; IWAMASA, J.; MIYAZAKI, K.; OKAMURA, H. Adnexal masses: accuracy of characterization with transvaginal US and precontrast and post contrast MR imaging. *Radiology*, v. 194, p. 557–565, 1995.
73. REUTER, M.; STEFFENS, J.; SCHUPPLER, U.; LUTTGES, J.; MUHLE, C.; BRINKMANN, G.; MASCHEK, A.; WEISNER, D.; SPIELMANN, R.; HELLER, M. Critical evaluation of the specificity of MRI and TVUS for differentiation of malignant from benign adnexal lesions. *European Radiology* v. 8, p. 39–44, 1998.
74. HAMM, B.; KUBIK-HUCH, R. A.; FLEIGE, B. MR imaging and CT of the female pelvis: radiologic-pathologic correlation. *European Radiology*, v. 9, p. 3-15, 1999.
75. FUNT, S. A.; HANN, L. E. Detection and characterization of adnexal masses. *Radiologic Clinics of North America*, v. 40, p. 591–608, 2002.
76. SOHAIB, S. A.; SAHDEV, A.; VAN TRAPPEN, P.; JACOBS, I. J.; REZNEK, R. H. Characterization of adnexal mass lesions on MR imaging. *American Journal of Roentology*, v. 180, p. 1297–1304, 2003.
77. TSILI, A. C.; TSAMPOULAS, C.; ARGYROPOULOU, M.; NAVROZOGLOU, I.; ALAMANOS, Y.; PARASKEVAIDIS, E.; EFREMIDIS, S. C. Comparative evaluation of multidetector CT and MR imaging in the differentiation of adnexal masses. *European Radiology*, v. 18, p. 1049–1057, 2008.
78. MOHAGHEGH, P.; ROCKALL, A. G. Imaging strategy for early ovarian cancer: characterization of adnexal masses with conventional and advanced imaging techniques. *RadioGraphics*, v. 32, p. 1751–1773, 2012.
79. WAKEFIELD, J. C.; DOWNEY, K.; KYRIAZI, S.; SOUZA, N. M. New MR techniques in gynecologic cancer. *American Journal of Roentology*, v. 200, p. 249–260, 2013.
80. TROIANO, R. N.; LAZZARINI, K. M.; SCOUTT, L. M.; LANGE, R. C.; FLYNN, S. D.; MCCARTHY, S. Fibroma and fibrothecoma of the ovary: MR imaging findings. *Radiology*, v. 204, n. 3, p. 795-798, 1997.
81. SIEGELMAN, E. S.; OUTWATER, E. K. Tissue characterization in the female pelvis. *Radiology*, v. 212, p. 5–1, 1999.
82. JEONG, Y, Y.; OUTWATER, E. K.; KANG, H. K. Imaging evaluation of ovarian masses. *Radiographics*, v. 20, p. 1445–1470, 2000.
83. TAKESHITA, T.; SHIMA, H.; OISHI, S.; MACHIDA, N.; YAMAZAKI, K.; IMAMURA, T.; UCHIYAMA, K. Ovarian fibroma (fibrothecoma) with extensive cystic degeneration: unusual MR imaging findings in two cases. *Radiation Medicine*, v. 23, n. 1, p. 70-74, 2005.
84. KIMURA, I.; TOGASHI, K.; KAWAKAMI, S.; TAKAKURA, K.; MORI, T.; KONISHI, J. Ovarian torsion: CT and MR imaging appearances. *Radiology*, v. 190, n. 2, p. 337-341, 1994.
85. DUGENAN, S.; OLIVA, E.; LEE, S. I. Ovarian torsion: diagnostic features on CT and MRI with pathologic correlation. *American Journal of Roentgenology*, v. 198, p. W122–W131, 2012.
86. FEBRONIO, E. M.; NUNES, T. F.; CARDIA, P. P.; D'IPPOLITO, G. Ovarian torsion: pictorial essay focused on magnetic resonance imaging and computed tomography findings. *Radiologia Brasileira*, v. 45, n. 4, p. 225–229, 2012.
87. TEMPANY, C. M.; ZOU, K. H.; SILVERMAN, S. G.; BROWN, D. L.; KURTZ, A. B.; MCNEIL, B. J. Staging of advanced ovarian cancer: comparison of imaging modalities— report from the radiological diagnostic oncology group. *Radiology*, v. 215, p. 761–767, 2000.

88. GHOSSAIN, M. A.; BUY, J. N.; LIGNERES, C.; BAZOT, M.; HASSEN, K.; MALBEC, L.; HUGOL, D.; TRUC, J. B.; DECROIX, Y.; POITOUT, P. Epithelial tumors of the ovary: comparison of MR and CT findings. *Radiology*, v. 181, n. 3, p. 863-870, 1991.
89. OCCHIPINTI, K. A.; FRANKEL, S. D.; HRICAK, H. The ovary. Computed tomography and magnetic resonance imaging. *Radiology Clinics of North America*, v.31, n. 5, p. 1115-1132, 1993.
90. KURTZ, A. B.; TSIMIKAS, J. V.; TEMPANY, C. M.; HAMPER, U. M.; ARGER, P. H.; BREE, R. L.; WECHSLER, R. J.; FRANCIS, I. R.; KUHLMAN, J. E.; SIEGELMAN, E. S.; MITCHELL, D. G.; SILVERMAN, S. G.; BROWN, D. L.; SHETH, S.; COLEMAN, B. G.; ELLIS, J. H.; KURMAN, R. J.; CAUDRY, D. J.; MCNEIL, B. J. Diagnosis and staging of ovarian cancer: comparative values of Doppler and conventional US, CT, and MR imaging correlated with surgery and histopathologic analysis—report of the Radiology Diagnostic Oncology Group. *Radiology*, v. 212, p. 19–27, 1999.
91. BROWN, D. L.; ZOU, K. H.; TEMPANY, C. M.; FRATES, M. C.; SILVERMAN, S. G.; MCNEIL, B. J.; KURTZ, A. B. Primary versus secondary ovarian malignancy: imaging findings of adnexal masses in the radiology diagnostic oncology group study. *Radiology*, v. 219, n. 1, p. 213-218, 2001.
92. RIEBER, A.; NUSSLE, K.; STOHR, I.; GRAB, D.; FENCHEL, S.; KREIENBERG, R.; RESKE, S. N.; BRAMBS, H. J. Preoperative diagnosis of ovarian tumors with MR imaging: comparison with transvaginal sonography, positron emission tomography, and histologic findings. *American Journal of Roentgenology*, v. 177, n. 1, p. 123-129, 2001.
93. SOHAIB, S. A.; MILLS, T. D.; SAHDEV, A.; WEBB, J. A.; VANTRAPPEN, P. O.; JACOBS, I. J.; REZNEK, R. H. L. The role of magnetic resonance imaging and ultrasound in patients with adnexal masses. *Clinical Radiology*, v. 60, n. 3, p. 340–348, 2005.
94. LIU, J.; XU, Y.; WANG, J. Ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for diagnosis of ovarian carcinoma. *European Journal of Radiology*, v. 62, n. 3, p. 328-334, 2007.
95. SOHAIB, S. A. A.; REZNEK, R. H. MR imaging in ovarian cancer. *Cancer Imaging*, v. 7, p. S119-S129, 2007.
96. ENGELEN, M. J. A.; BONGAERTS, A. H. H.; SLUITER, W. J.; HAAN, H. H.; BOGCHELMAN, D. H.; TENVERGERT, E. L.; WILLEMSE, P. H. B.; VAN DER ZEE, A. G. J. Distinguishing benign and malignant pelvic masses: The value of different diagnostic methods in everyday clinical practice. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* v. 136, p. 94–101, 2008.
97. LOW, R. N.; SIGETI, J. S. MR imaging of peritoneal disease: comparison of contrast-enhanced fast multiplanar spoiled gradient recalled and spin echo sequence. *American Journal of Roentgenology*, v. 163, p. 1131-1140, 1994.
98. STEVENS, S. K.; HRICAK, H.; STERN, J. L. Ovarian lesions: detection and characterization with gadolinium-enhanced MR imaging at 1.5 T. *Radiology*, v. 181, n. 2, p. 481-488, 1991.
99. KOMATSU, T.; KONISHI, I.; MANDAI, M.; TOGASHI, K.; KAWAKAMI, S.; KONISHI, J.; MORI, T. Adnexal masses: transvaginal US and gadolinium-enhanced MR imaging assessment of intratumoral structure. *Radiology*, v. 198, n. 1, p. 109-115, 1996.
100. SCOUTT, L. M.; MCCARTHY, S. M.; LANGE, R. BOURQUE, A.; SCHWARTZ, P. E. MR evaluation of clinically suspected adnexal masses. *Journal of Computer Assisted Tomography*, v. 18, p. 609–618, 1994.
101. SCHWARTZ, L. B.; PANAGEAS, E.; LANGE, R.; RIZZO, J.; COMITE, F.; MCCARTHY, S. Female pelvis: impact of MR imaging on treatment decisions and net cost analysis. *Radiology*, v. 192, p. 55–60, 1994.
102. FISCHEROVA, D.; BURGETOVA, A. Imaging techniques for the evaluation of ovarian cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, in press, 2014.
103. RODRIGUES, A. F.; VITRAL, R. W. F. Applications of computed tomography in dentistry. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 7, n. 3, p. 317-324, 2007.

104. SHARPE, J.; AHLGREN, U.; PERRY, P.; HILL, B.; ROSS, A.; HECKSHER-SORENSEN, J.; BALDOCK, R.; DAVIDSON, D. Optical projection tomography as a tool for 3d microscopy and gene expression studies. *Science*, v. 296, n. 19, p. 541-545, 2002.
105. BURSTEIN, P.; BJORKHOLM, P. J.; CHASE, R. C.; SEGUIN, F. H. The largest and smallest X-ray computed tomography systems. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, v. 221, n. 1, p. 207-212, 1984.
106. FELDKAMP, L. A.; DAVIS, L. C.; KRESS, J. W. Practical cone-beam algorithm. *Journal of the Optical Society of America*, v. 1, p. 612-619, 1984.
107. KALENDER, W. Spiral volumetric CT with single-breath-hold technique, continuous scanner rotation. *Radiology*, v. 176, n. 1, p. 181-183, 1990.
108. WONG, K.; FOSTER, B. B.; LI, D. K. B.; ALDRICH, J. E. A simple method of assessing the temporomandibular joint with helical computed tomography: technical note. *Canadian Association of Radiologists Journal*, v. 50, n. 2, p. 117-120, 1999.
109. CARSON R. E. *Tracer Kinetic Modeling in PET*. In: Positron Emission Tomography - Basic sciences. Springer: London, 2005, p. 127-159.
110. NAGASE, T.; SASAZAKI, Y.; KIKUCHI, T.; MACHIDA, M. Rapid 3-dimensional imaging of embryonic craniofacial morphology using microscopic computed tomography. *Journal of Computer Assisted Tomography*, v. 32, n. 5, p. 816-821, 2008.
111. SCHLADITZ, K. Quantitative micro-Ct. *Journal of Microscopy*, v. 243, p. 111-117, 2011.
112. TADROUS, P. J. Methods for imaging the structure and function of living tissues and cells: 1. Optical coherence tomography. *Journal of Pathology*, v. 191, p. 115-119, 2000.
113. METSCHER, B. D. MicroCT for developmental biology: a versatile tool for high-contrast 3d imaging at histological resolutions. *Developmental Dynamics*, v. 238, p. 632-640, 2009.
114. ULRICH, D.; HILDEBRAND, T.; VAN RIETBERGEN, B.; MULLER, R.; RUEGSEGGER, P. The quality of trabecular bone evaluated with micro-computed tomography, FEA and mechanical testing. *Studies in Health Technology and Informatics*, v. 40, p. 97-112, 1997.
115. GENANT, H. K.; GORDON, C.; JIANG, Y.; LINK, T. M.; HANS, D.; MAJUMDAR, S.; LANG, T. F. Advanced imaging of the macrostructure and microstructure of bone. *Hormone Research*, v. 54, n. 1, p. 24-30, 2000.
116. FAJARDO, R. J.; RYAN, T. M.; KAPPELMAN, J. Assessing the accuracy of high-resolution x-ray computed tomography of primate trabecular bone by comparisons with histological sections. *American Journal of Physical Anthropology*, v. 118, p. 1-10, 2002.
117. GENANT, H. K.; JIANG, Y. Advanced imaging assessment of bone quality. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1068, p. 410-428, 2006.
118. MULLER, R. Hierarchical microimaging of bone structure and function. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 5, p. 373-381, 2009.
119. BURGHARDT, A. J.; LINK, T. M.; MAJUMAR, S. High-resolution computed tomography for clinical paging of bone microstructure. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 469, p. 2179-2193, 2011.
120. PARTICELLI, F.; MECOZZI, L.; BERAUDI, A.; MONTESI, M.; BARUFFALDI, F.; VICECONTI, M. A comparison between micro-CT and histology for the evaluation of cortical bone: effect of polymethylmethacrylate embedding on structural parameters. *Journal of Microscopy*, v. 245, n. 3, p. 302-310, 2012.
121. PEYRIN, F. Evaluation of bone scaffolds by micro-CT. *Osteoporosis International*, v. 20, p. 2043-2048, 2011.
122. TEARNEY, G. J.; YABUSHITA, Y.; HOUSER, S. L.; ARETZ, H. T.; JANG, I. K.; SCHLENDORF, H.; KAUFFMAN, C. R.; SHISHKOV, M.; HALPERN, E. F.; BOUMA, B. E. Quantification of macrophage content in atherosclerotic plaques by optical coherence tomography. *Circulation*, v. 107, n. 1, p. 113-119, 2003.

123. PERLYN, C. A.; DELEON, V. B.; BABBS, C.; GOVIER, D.; BURELL, L.; DARVANN, T.; KREIBORG, S.; MORRISS-KAY, G. The craniofacial phenotype of the Crouzon mouse: analysis of a model for syndromic craniosynostosis using three-dimensional MicroCT. *The Cleft Palate Craniofacial Journal*, v. 43, n. 6, p. 740-748, 2006.
124. TEARNEY, G. J.; JANG, I. K.; BOUMA, B. E. Optical coherence tomography for imaging the vulnerable plaque. *Journal of Biomedical Optics*, v. 11, n. 2, p. 021002, 2006.
125. BARLIS, P.; SERRUYS, P. W.; GONZALO, N.; VAN DER GIESSEN, W. J.; DE JAEGERE, P.; REGAR, E. Assessment of culprit and remote coronary narrowings using optical coherence tomography with long-term outcomes. *American Journal of Cardiology*, v. 102, n. 4, p. 391-395, 2008.
126. MISSBACH-GUENTNER, J.; HUNIA, J.; ALVES, F. Tumor blood vessel visualization. *The International Journal of Developmental Biology*, v. 55, p. 535-546, 2011.
127. NEBULONI, L.; KUHN, G. A.; VOGEL, J.; MULLER, R. A Novel in vivo vascular imaging approach for hierarchical quantification of vasculature using contrast enhanced micro-computed tomography. *Plos One*, v. 9, n. 1, p. e86562, 2014.
128. FUJIMOTO, J. G.; BREZINSKI, M. E.; TEARNEY, G. J.; BOPPART, S. A.; BOUMA, B.; HEE, M. R.; SOUTHERN, J. F.; SWANSON, E. A. Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography. *Nature Medicine*, v. 1, p. 970-972, 1995.
129. CHEN, T. C.; ZENG, A.; SUN, W.; MUJAT, M.; DE BOER, J. F. Spectral domain optical coherence tomography and glaucoma. *International Ophthalmology Clinics*, v. 48, n. 4, p. 29-45, 2008.
130. DREXLER, W. Cellular and functional optical coherence tomography of the human retina: the Cogan lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 48, n. 12, p. 5339-5351, 2008.
131. SRINIVASAN, V. J.; CHEN, Y.; DUKER, J. S.; FUJIMOTO, J. G. In vivo functional imaging of intrinsic scattering changes in the human retina with high-speed ultrahigh resolution OCT. *Optics Express*, v. 35, n. 5, p. 3861-3877, 2009.
132. WANG, R. K.; AN, L.; FRANCIS, P.; WILSON, D. J. Depth-resolved imaging of capillary networks in retina and choroid using ultrahigh sensitive optical microangiography. *Optics Letters*, v. 35, n. 9, p. 1467-1469, 2010.
133. SCHAMBACH, S. J.; BAG, S.; SCHILLING, L.; GRODEN, C. H.; BROCKMANN, M.A. (2010). Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods*, v. 50, p. 2-13, 2010.
134. COLEMAN, R. E. PET in lung cancer. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 40, n. 5, p. 814-820, 1999.
135. MCNALLY, J. B.; KIRKPATRICK, N. D.; HARIRI, L. P.; TUMLINSON, A. R.; BESSELS, D. G.; GERNER, E. W.; UTZINGER, U.; BARTON, J. K. Task-based imaging of colon cancer in the Apc(Min/+) mouse model. *Applied Optics*, v. 45, n. 13, p. 3049-3062, 2006.
136. NG, C. S.; WEI, W.; DOYLE, T. C.; COURTNEY, H. M.; DIXON, A. K.; FREEMAN, A. H. Minimal-preparation abdomino-pelvic CT in frail and elderly patients: prognostic value of colonic and extracolonic findings. *Clinical Radiology*, v. 63, n. 4, p. 424-432, 2008.
137. SUTER, M. J.; VAKOC, B. J.; YACHIMSKI, P. S.; SHISHKOV, M.; LAUWERS, G. Y.; MINO-KENUDSON, M.; BOUMA, B. E.; NISHIOKA, N. S.; TEARNEY, G. J. Comprehensive microscopy of the esophagus in human patients with optical frequency domain imaging. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 68, n. 4, p. 745-753, 2008.
138. TESTONI, P. A.; MANGIAVILLANO, B. Optical coherence tomography in detection of dysplasia and cancer of the gastrointestinal tract and bilio-pancreatic ductal system. *World Journal Gastroenterology*, v. 14, n. 42, p. 6444-6452, 2008.
139. COBB, M. J.; HWANG, J. H.; UPTON, M. P.; CHEN, Y. C.; OELSCHLAGER, B. K.; WOOD, D. R.; KIMMEY, M. B.; LI, X. Imaging of subsquamous Barrett's epithelium with ultrahigh-resolution optical coherence tomography: a histologic correlation study. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 71, n. 2, p. 223-230, 2010.

140. HEYER, C. M.; MOHR, P. S.; LEMBURG, S. P.; PETERS, S. A.; NICOLAS, V. Image quality and radiation exposure at pulmonary CT angiography with 100- or 120-kvp protocol: prospective randomized study. *Radiology*, v. 245, n. 2, p. 577-583, 2007.
141. WAAIJER, A.; PROKOP, M.; VELTHUIS, B. K.; BAKKER, C. J.; DE KORT, G. A.; VAN LEEUWEN, M. S. Circle of Willis at CT angiography: dose reduction and image quality-reducing tube voltage and increasing tube current settings. *Radiology*, v. 242, n. 3, p. 832-839, 2007.
142. JOHNSON, T.; HANSEN, M. S.; WU, I.; HEALY, L. J.; JOHNSON, C. R.; JONES, G. M.; CAPECCHI, M. R.; KELLER, C. Virtual Histology of Transgenic Mouse Embryos for High-Throughput Phenotyping. *PLoS Genetics*, v. 2, n. 4, p. 471-477, 2006.
143. BREWER, M. A.; UTZINGER, U.; BARTON, J. K.; HOYING, J. B.; KIRKPATRICK, N. D.; BRANDS, W. R.; DAVIS, J. R.; HUNT, K.; STEVENS, S. J.; GMITRO, A. F. Imaging of the ovary. *Technology in Cancer Research & Treatment*, v. 3, n. 6, p. 617-627, 2004.
144. KANTER, E. M.; WALKER, R. M.; MARION, S. L.; BREWER, M. Dual modality imaging of a novel rat model of ovarian carcinogenesis. *Journal of Biomedical Optics*, v. 11, n. 4, p. 041123/1-41123/10, 2006.
145. PAULUS, M. J.; GLEASON, S. S.; KENNEL, S. J.; HUNSICKER, P. R.; JOHNSON, D. K. High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia*, v. 2, p. 62-70, 2000.
146. MA, X.; TIAN, J.; YANG, X.; QIN, C. Molecular paging in tumor angiogenesis and relevant drug research. *International Journal of Biomedical Imaging*, v. 2011, p. 370701, 2011.
147. ASHTON, J. R.; CLARK, D. P.; MODING, E. J.; GHAGHADA, K.; KIRSCH, D. G. WEST, J. L.; BADEA, C. T. Dual energy micro-CT functional imaging of primary lung cancer in mice using gold and iodine nanoparticle contrast agents: a validation study. *Plos One*, v. 9, n. 2, p. e88129, 2014.
148. FELDKAMP, L. A.; GOLDSTEIN, S. A.; PARFITT, A. M.; JESION, G.; KLEEREKOPER, M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, V. 3, p. 3-11, 1989.
149. NAWARATNE, S.; FABINY, R.; BRIEN, J. E.; ZALCBERG, J.; COSOLO, W.; WHAN, A.; MORGAN, D. J. Accuracy of volume measurement using helical CT. *Journal of Computer Assisted Tomography*, v. 21, p. 481-486, 1997.
150. MUKHERJI, S. K.; TOLEDANO, A. Y.; BELDON, C.; SCHMALFUSS, I. M.; COOPER, J. S.; SICKS, J. D.; AMDUR, R.; SAILER, S.; LOEVNER, L. A.; KOUSOUBORIS, P.; ANG, K. Interobserver reliability of computed tomography-derived primary tumor volume measurement in patients with supraglottic carcinoma. *Cancer*, v. 103, p. 2616-2622, 2005.
151. MACSWEENEY, J. E.; KING, D. M. Computed tomography, diagnosis, staging and follow-up of pure granulosa cell tumour of the ovary. *Clinical Radiology*, v. 49, n. 4, p. 241-245, 1994.
152. KUMAR, P.; REHANI, M. M.; KUMAR, L.; SHARMA, R.; BHATLA, N.; SINGH, R.; SUNDARAM, K. R. Potential of CT-scan based tumor volume as CR a response indicator in chemotherapy of advanced epithelial ovarian cancer. *Medical Science Monitor*, v. 8, n. 10, p. CR667-674, 2002.
153. METSCHER, B. D. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiology*, v. 9, p. 11, 2009b.
154. MARSEN, M.; PAGET, C.; YU, X.; HENKELMAN, R. M. Estimating perfusion using micro-CT to locate microspheres. *Physics in Medicine and Biology*, v. 51, p. N9-16, 2006.
155. KARAOSMANOGLU, D.; KARCAALTINCABA, M.; KARCAALTINCABA, D.; AKATA, D.; OZMEN, M. MDCT of the ovarian vein: normal anatomy and pathology. *American Journal of Roentgenology*, v. 192, p. 295-299, 2009.

156. BAE, K. T. Intravenous contrast medium administration and scan timing at CT: considerations and approaches. *Radiology*, v. 256, n. 1, p. 32-61, 2010.
157. JONES, J. C.; APPT, S. E.; WERRE, S. R.; TAN, J. C.; KAPLAN, J. R. Validation of multi-detector computed tomography as a non-invasive method for measuring ovarian volume in macaques (*Macaca fascicularis*). *American Journal of Primatology*, v. 72, n. 6, p. 530–538, 2010.
158. BUY, J. N.; MOSS, A. A.; GHOSAIN, M. A.; SCIOT, C.; MALBEC, L.; VADROT, D.; PANIEL, B. J.; DECROIX, Y. Peritoneal implants from ovarian tumors: CT findings. *Radiology*, v. 169, n. 3, p. 691-694, 1988.
159. HALVORSEN JR., R. A.; PANUSHKA, C.; OAKLEY, G. J.; LETOURNEAU, J. G.; ADCOCK, L. L. Intraperitoneal contrast material improves the CT detection of peritoneal metastases. *American Journal of Roentgenology*, v. 157, n. 1, p. 37-40, 1991.
160. FOSHAGER, M. C.; HOOD, L. L.; WALSH, J. W. Masses simulating gynecologic diseases at CT and MR. *Radiographics*, v. 16, p. 1085-1099, 1996.
161. LEVINE, C. D.; PATEL, U. J.; GHANEKAR, D.; WACHSBERG, R. H. Benign extraovarian mimics of ovarian cancer: distinction with imaging studies. *Clinical Imaging*, v. 21, p. 350-358, 1997.
162. PANNU, H. K.; BRISTOW, R. E.; MONTZ, F. J.; FISHMAN, E. K. Multidetector CT of peritoneal carcinomatosis from ovarian cancer. *RadioGraphics*, v. 23, p. 687–701, 2003.
163. KITAJIMA, K.; MURAKAMI, K.; YAMASAKI, E.; KAJI, Y.; FUKASAWA, I.; INABA, N.; SUGIMURA, K. Diagnostic accuracy of integrated FDG-PET/contrast-enhanced CT in staging ovarian cancer: comparison with enhanced CT. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 35, p. 1912–1920, 2008.
164. FOSHAGER, M. C.; WALSH, J. W. CT anatomy of the female pelvis: a second look. *Radiographics*, v. 14 n. 1, 51-66, 1994.
165. BOPPART, S. A.; BOUMA, B. E.; PITRIS, C.; TEARNEY, G. J.; FUJIMOTO, J. G.; BREZINSKI, M. E. Forward imaging instruments for optical coherence tomography. *Optics Letters*, v. 22, n. 21, p. 1618–1620, 1997.
166. BOPPART, S. A.; GOODMAN, A.; LIBUS, J.; PITRIS, C.; JESSER, C. A.; BREZINSKI, M. E.; FUJIMOTO, J. G. High resolution imaging of endometriosis and ovarian carcinoma with optical coherence tomography: feasibility for laparoscopic-based imaging. *British Journal of Obstetrics & Gynaecology*, v. 106, n. 10, p. 1071–1077, 1999.
167. SAKSOUK, F. A.; JOHNSON, S. C. recognition of the ovaries and ovarian origin of pelvic masses with CT. *RadioGraphics*, v. 24, p. S133–S146, 2004.
168. JONES, J. C.; APPT, S. E.; BOURLAND, J. D.; HOYER, P. B.; CLARKSON, T. B.; KAPLAN, J. R. Multidetector computed tomographic morphology of ovaries in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 46, n. 5, p. 54-63, 2007.
169. ROZENBLIT, A. M.; RICCI, Z. J.; TUVIA, J.; AMIS JUNIOR, E. S. Incompetent and dilated ovarian veins: a common CT finding in asymptomatic parous women. *American Journal of Roentgenology*, v. 176, p. 119–122, 2001.
170. HARIRI, L. P.; LIEBMANN, E. R.; MARION, S. L.; HOYER, P. B.; DAVIS, J. R.; BREWER, M. A.; BARTON, J. K. Simultaneous optical coherence tomography and laser induced fluorescence imaging in rat model of ovarian carcinogenesis. *Cancer Biology & Therapy*, v. 10, n. 5, p. 1-10, 2010;
171. SAWYER, R. W.; VICK, C. W.; WALSH, J. W.; MCCLURE, P. H. Computed tomography of benign ovarian masses. *Journal of Computer Assisted Tomography*, v. 9, n. 4, p. 784-789, 1985.

172. BUY, J. N.; GHOSAIN, M. A.; SCIOT, C.; BAZOT, M.; GUINET, C.; PREVOT, S.; HUGOL, D.; LAROMIGUIERE, M.; TRUC, J. B.; POITOUT, P. Epithelial tumors of the ovary: CT findings and correlation with US. *Radiology*, v. 178, n. 3, p. 811-818, 1991.
173. WALSH, J. W. Computed tomography of gynecologic neoplasms. *Radiologic Clinics of North America*, v. 30, n. 4, p. 817-830, 1992.
174. HAMM, B. Computer tomographie und MR-tomographie in der diagnostic von ovarien tumoren. *Radiologe*, v. 34, p. 362-369, 1994.
175. LEE, J. H.; JEONG, Y. K.; PARK, J. K.; HWANG, J. C. Ovarian vascular pedicle sign revealing organ of origin of a pelvic mass lesion on helical CT. *American Journal of Roentgenology*, v. 181, p. 131-137, 2003.
176. EVANS, C. L.; RIZVI, I.; HASAN, T.; BOER, J. F. In vitro ovarian tumor growth and treatment response dynamics visualized with time-lapse OCT imaging. *Optics Express*, v. 17, n. 11, p. 8892-8906, 2009.
177. HARIRI, L. P.; BONNEMA, G. T.; SCHMIDT, K.; WINKLER, A. M.; KORDE, V.; HATCH, K. D.; DAVIS, J. R.; BREWER, M. A.; BARTON, J. K. Laparoscopic optical coherence tomography imaging of human ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 114, n. 2, p. 188-194, 2009.
178. YOSHIDA, Y.; KUROKAWA, T.; TSUJIKAWA, T.; OKAZAWA, H.; KOTSUJI, F. Positron emission tomography in ovarian cancer: 18F-deoxy-glucose and 16 α -18F-fluoro-17 β -estradiol PET. *Journal of Ovarian Research*, v. 2, p. 7, 2009.
179. YANG, Y.; BISWAL, N. C.; WANG, T.; KUMAVOR, P. D.; KARIMEDDINI, M.; VENTO, J.; SANDERS, M.; BREWER, M.; ZHU, Q. Potential role of a hybrid intraoperative probe based on OCT and positron detection for ovarian cancer detection and characterization. *Biomedical Optics Express*, v. 2, n. 7, p. 1918-1930, 2011.
180. YANG, Y.; LI, X.; WANG, T.; KUMAVOR, P. D.; AGUIRRE, A.; SHUNG, K. K.; ZHOU, Q.; SANDERS, M.; BREWER, M.; ZHU, Q. Integrated optical coherence tomography, ultrasound and photoacoustic imaging for ovarian tissue characterization. *Biomedical Optics Express*, v. 2, n. 9, p. 2551-2561, 2011.
181. MEGIBOW, A. J.; BOSNIAK, M. A.; HO, A. G.; BELLER, U.; HULNICK, D. H.; BECKMAN, E. M. Accuracy of CT in detection of persistent or recurrent ovarian carcinoma: correlation with second-look laparotomy. *Radiology*, v. 166, n. 2, p. 341-345, 1998.
182. RIGSBY, C. K.; SIEGEL, M. J. CT appearance of pediatric ovaries and uterus. *Journal of Computer Assisted Tomography*, v. 18, n. 1, p. 72-76, 1994.
183. BASHIST, B.; FREIDMAN, W. N.; KILLACKEY, M. A. Surgical transposition of the ovary: radiologic appearance. *Radiology*, v. 173, p. 857-860, 1989.
184. WEIBEL, E. R. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. *Journal of Microscopy*, 155, 393-403, 1989.
185. BRITZ, H. M.; JOKIHAARA, J.; LEPPANEN, O. V.; JARVINEN, T.; COOPER, D. M. 3D visualization and quantification of rat cortical bone porosity using a desktop micro-CT system: a case study in the tibia. *Journal of Microscopy*, v. 240, p. 32-37, 2010.
186. LASSO, P. R. O.; VAZ, C. M. P.; NAIME, J. M. *Recomendações para utilização do microtomógrafo de raios-X Sky Scan 1172 em ciências agrárias e biológicas*. In: Documentos. 1.ed. Embrapa: Brasília, 2008, 21p.
187. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 9.ed. Guanabara & Koogan: Rio de Janeiro, 2008, 427p.
188. ATAYA, K. M.; MCKANNA, J. A.; WEINTRAUB, A. M.; CLARK, M. R.; LEMAIRE, W. J. A Luteinizing hormone-releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy-induced ovarian follicular loss in rats. *Cancer Research*, v. 45, p. 3651-3656, 1985.
189. MYERS, H. I.; YOUNG, W. C.; DEMPSEY, E. W. Graafian follicle development throughout the reproductive cycle in the guinea pig, with especial reference to changes during estrus (sexual receptivity). *The Anatomical Record*, v. 65, p. 381-401, 1936.
190. BAKER, T. G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 158, p. 417-433, 1963.

191. BAKER, T. G. A quantitative and cytological study of oogenesis in the rhesus monkey. *Journal of Anatomy*, v. 100, n. 4, p. 761–776, 1966.
192. ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*, v. 25, p. 800-805, 1966.
193. ERICKSON, B. H.; REYNOLDS, R. A.; MURPHREE, R. L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. *Biology of Reproduction*, v. 15, 555-560, 1976.
194. MARION, G. B.; GIER, H. T.; CHOUDARY, J. B. Micromorphology of the bovine ovarian follicular system. *Journal of Animal Science*, v. 27, p. 451-465, 1968.
195. PETERS, H. The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinologica*, v. 62, n. 1, p. 98-116, 1969.
196. LAND, R. B. Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and finnish landrace cross blackface and welsh sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 21, p. 517-521, 1970.
197. LINTERN-MOORE, S.; PETERS, H; MOORE, G. P. M; FABER, M. Follicular development in the infant human ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 20, p. 773-778, 1974.
198. HIMELSTEIN-BRAW, R.; BYSKOV, A. G.; PETERS, H.; FABER, M. Follicular atresia in the infant human ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 46, n. 1, p. 55-59, 1976.
199. LINTERN-MOORE, S.; MOORE, G. P. The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biology of Reproduction*, v. 20, n. 4, p. 773-778, 1979.
200. GUILBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; HAIBEL, G. K. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. *Journal of Reproduction & Fertility*, v. 78, p. 127-135, 1986.
201. GOSDEN, R. G.; TELFER, E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *Journal of Zoology*, v. 211, p. 169-175, 1987.
202. GOUGEON, A.; CHAINY, G. B. N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 81, p. 433-442, 1987.
203. HIRSHFIELD AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, v. 124, 143-101, 1991.
204. MORBECK, D. E.; ESBENSHADE, K. L.; FLOWERS, W. L.; BRETTF, J. H. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of Reproduction*, v. 47, p. 485-491, 1992.
205. HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *The Veterinary Quarterly*, v. 16, n. 2, p. 78-80, 1994.
206. GOUGEON, A.; ECOCHARD, R.; THALABARD, J. C. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biology of Reproduction*, v. 50, p. 653-663, 1994.
207. ARIYARATNA, H. B. S.; GUNAWARDANA, V. K. Morphology and morphometry of ovarian follicles in the goat. *Small Ruminant Research*, v. 26, p. 123- 129, 1997.
208. LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R. V.; GONÇALVES, P. B. D. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Animal Reproduction Science*, v. 56, p. 223-236, 1999.
209. LUNDY, T.; SMITH, P.; O'CONNELL, A.; HUDSON, N. L. MCNATTY, K. P. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 115, p. 251-262, 1999.
210. LUCCI, C. M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J. R.; BAO, S. N: Zebu (*bos indicus*) ovarian preantral follicles. Morphological characterization and development of an efficient isolation method. *Theriogenology*, v. 57, p. 1467-1483, 2002.
211. DOMINGUES, S. F. S.; DINIZ, L. V.; FURTADO, S. H. C.; OHASHI, O. M.; RONDINA, D.; SILVA, L. D. M. Histological study of capuchin monkey (*cebus apella*) ovarian follicles. *Acta Amazonica*, v. 34, p. 495-501, 2004.

212. MYERS, M.; BRITT, K. L.; WREFORD, N. G. M.; EBLING, F. J. P.; KERR, J. B. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, v. 127, p. 569–580, 2004.
213. JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J. K.; TILLY, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, v. 11, n. 428, p. 145-50, 2004.
214. JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H. J.; ADAMS, G. B.; NIIKURA, Y.; TSCHUDY, K. S.; TILLY, J. C.; CORTES, M. L.; FORKERT, R.; SPITZER, T.; IACOMINI, J.; SCADDEN, D. T.; TILLY, J. L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, v. 122, n. 2, p. 303-315 2005.
215. FORABOSCO, A.; SFORZA, C. Establishment of ovarian reserve: a quantitative morphometric study of the developing human ovary. *Fertility and Sterility*, v. 88, n. 3, p. 675-683, 2007.
216. MOHAMED, G. F. Ovarian follicles development and atresia during the estrous cycle in adult female albino rats. Immunohistochemical, light and scanning electron microscopic study. *The Egyptian Journal of Histology*, v. 30, n. 2, p. 289 – 300, 2007.
217. BOUBEKRI, A.; GERNIGON-SPYCHALOWICZ, T.; KHAMMAR, F.; EXBRAYAT, J. M. Morphometry and immunohistochemistry of follicles growth and steroidogenesis in saharian wild sand rat, *Psammomys obesus*, ovary. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, v. 47, n. 5, p. S59-S66, 2009.
218. CARRIJO JR, O. A.; MARINHO, A. P.; CAMPOS, A. A.; AMORIM, C. A.; BAO, S. N.; LUCCI, C. M. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. *Cells, tissues, organs*, v. 191, p. 152-160, 2010.
219. MONDADORI, R. G.; SANTIN, T. R.; FIDELIS, A. A.; PORFIRIO, E. P.; BAO, S. N. Buffalo (*bubalus bubalis*) pre-antral follicle population and ultrastructural characterization of antral follicle oocyte. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45, p. 33-37, 2010.
220. SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I.; STURION, L.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *bos taurus indicus* and *bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, v. 76, p. 1051-1057, 2011.
221. STANSFIELD, F. J.; PICTON, H. M.; NOTHLING, J. O. Early primary-rather than primordial follicles constitute the main follicular reserve in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Animal Reproduction Science*, v.123, p. 112–118, 2011.
222. BHARTIYA, D.; SRIRAMAN, K.; GUNJAL, P.; MODAK, H. Gonadotropin treatment augments postnatal oogenesis and primordial follicle assembly in adult mouse ovaries? *Journal of Ovarian Research*, v. 5, p. 32, 2012.
223. KERR, J. B.; MYERS, M.; ANDERSON, R. A. The dynamics of the primordial follicle reserve. *Reproduction*, v. 146, p. R205–R215, 2013.
224. YOUNG, R. H.; GILKS, C. B.; SCULLY, R. E. Mucinous tumors of the appendix associated with mucinous tumors of the ovary and pseudomyxoma peritonei: a clinicopathological analysis of 22 cases supporting an origin in the appendix. *American Journal of Surgical Pathology*, v. 15, p. 415-429, 1991.
225. PETRU, E.; PICKEL, H.; HEYDARFADAI, M.; LAHOUSEN, M.; HAAS, J.; SCHAUER, H.; TAMUSSINO, K. Nongenital cancers metastatic to the ovary. *Gynecologic Oncology*, v. 44, p. 83-86, 1992.
226. SCHUMER, S. T.; CANNISTRA, S. A. Granulosa cell tumor of the ovary. *Journal of Clinical Oncology*, v. 21, p. 1180-1189, 2003.
227. CASTELLUCCI, P.; PERRONE, A. M.; PICCHIO, M.; GHI, T.; FARSAF, M.; NANNI, C.; MESSA, C.; MERIGGIOLA, M. C.; PELUSI, G.; AL-NAHHAS, A.; RUBELLO, D.; FAZIO, F.; FANTI, S. Diagnostic accuracy of 18F-FDG PET/CT in characterizing ovarian lesions and staging ovarian cancer: correlation with transvaginal ultrasonography, computed tomography, and histology. *Nuclear Medicine Communications*, v. 28, n. 8, p. 589-595, 2007.

228. ALVAREZ, J. V.; GOMEZ, M. M.; PRATS, M. D. G.; AGORRETA, M. A.; CAJAL, J. M. R.; LOPEZ, J. I. L.; GOYANES, J. R. R. Extraovarian primary peritoneal carcinoma. A case report. *Revista Española de Patología*, v. 40, n. 1, p. 47-52, 2007.
229. FOX, H. Ovarian Tumors: Histogenesis and systemic effect. *California Medicine*, v. 109, p. 295-300, 1968.
230. PULS, L. E.; POWELL, D. E.; DEPRIEST, P. D.; GALLION, H. H.; HUNTER, J. E.; KRYSCIO, R. J.; VAN NAGELL JR, J. R. Transition from benign to malignant epithelium in mucinous and serous ovarian cystadenocarcinoma. *Gynecologic Oncology*, v. 47, n. 1, p. 53-57, 1992.
231. WIKBORN, C.; PETTERSSON, F.; SILFVERSWARD, C.; MOBERG, P. J. Symptoms and diagnostic difficulties in ovarian epithelial cancer. *The International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 42, p. 261-264, 1993.
232. ZANETTA, G.; BONAZZI, C.; CANTU, M. A.; BINI, S.; LOCATELLI, A.; BRATINA, G.; MANGIONI, C. Survival and Reproductive function after treatment of malignant germ cell ovarian tumors. *Journal of Clinical Oncology*, v. 19, n. 4, p. 1015-1020, 2001.
233. FRANCO, S.; ANDRADE, M. J.; SILVA, T. S.; GUERRA, C.; OLIVEIRA, C. Tumor uterino semelhante ao tumor dos cordões sexuais do ovário. *Acta Médica Portuguesa*, v. 16, p. 365-367, 2003.
234. HORIUCHI, A.; ITOH, K.; SHIMIZU, M.; NAKAI, I.; YAMAZAKI, T.; KIMURA, K.; SUZUKI, A.; SHIOZAWA, I.; UEDA, N.; KONISHI, I. Toward understanding the natural history of ovarian carcinoma development: a clinicopathological approach. *Gynecologic Oncology*, v. 88, n. 3, p. 309-317, 2003.
235. BELL, D. A. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Modern Pathology*, v. 18, p. S19-S32, 2005.
236. WEBB, P. M.; PURDIE, D. M.; GROVER, S.; JORDAN, S.; DICK, M. L.; GREEN, A. C. Symptoms and diagnosis of borderline, early and advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, v. 92, p. 232-239, 2004.
237. KURIAN, A. W.; BALISE, R. R.; MCGUIRE, V.; WHITTEMORE, A. S. Histologic types of epithelial ovarian cancer: have they different risk factors? *Gynecologic Oncology*, v. 96, p. 520-530, 2005.
238. PECTASIDES, D.; PECTASIDES, E.; PSYRRI, A. Granulosa cell tumor of the ovary. *Cancer Treatment Reviews*, v. 34, p. 1-12, 2008.
239. LAZARETTI, N. S.; DALLAGASPERINA, V. W.; SCHLITTLER, L. A.; VILLARROEL, R. U.; SPINATO, G.; DETTMER, M. S.; RODRIGUEZ, R. Câncer de ovário pequenas células tipo hipercalcêmico (OSCCHT). *Arquivos de Medicina*, v. 23, n. 6, p. 217-20, 2009.
240. LURIE, G.; WILKENS, L. R.; THOMPSON, P. J.; MATSUNO, R. K.; CARNEY, M. E.; GOODMAN, M. T. Symptom presentation in invasive ovarian carcinoma by tumor histological type and grade in a multiethnic population: A case analysis. *Gynecologic Oncology*, v. 119, p. 278-284, 2010.
241. PARKINSON, C. A.; HATCHER, H. M.; EARL, H. M.; AJITHKUMAR, T. V. Multidisciplinary management of malignant ovarian germ cell tumours. *Gynecologic Oncology*, v. 121, p. 625-636, 2011.
242. SHEOMBAR, E. S.; LOGMANSB, A.; VERHOEFF, A.; VAN LENT, M. Ovarian cysts, cytology and histology: a conflicting story. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 52, p. 41-44, 1993.
243. VESCO, K. K.; CARNEY, M. E. Granulosa cell tumor of the ovary: extensive late recurrence after initial occult microscopic disease. *Obstetrics & Gynecology*, v. 99, p. 888-891, 2002.
244. EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction*, v. 54, p. 197-207, 1996.
245. BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 109, p. 165-171, 1997.

246. WANDJI, S. A.; SRSEN, V.; NATHANIELSZ, P.W.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. *Human Reproduction*, v. 12, n. 9 p.1993–2001, 1997.
247. PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*, v. 55, p. 1193-1210, 2001.
248. HASEGAWA, A.; HAMADA, Y.; MEHANDJIEV, T.; KOYAMA, K. In vitro growth and maturation as well as fertilization of mouse preantral oocytes from vitrified ovaries. *Fertility and Sterility*, v. 81, n. 1, p. 8240830, 2004.
249. SILVA, J. R. V.; THARASANIT, T.; TAVERNE, M. A. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. *Journal of Endocrinology*, v. 189, p. 113–125, 2006.
250. CHOI, J.; LEE, J. J.; LEE, E.; YOON, B. K.; BAE, D.; CHOI, D. Cryopreservation of the mouse ovary inhibits the onset of primordial follicle development. *Cryobiology*, v. 54, p. 55–62, 2007.
251. BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; LOPES, C. A. P.; MAIA-JR, J. E.; BÃO, S. N.; NOBRE JUNIOR, H. V.; MAIA, F. D.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Histological and ultrastructural feature and nitrite production of caprine preantral follicles in vitro cultured in the presence or absence of serum. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 6, p.1329-1337, 2008.
252. HUANG, L.; MO, Y.; WANG, M.; LI, Y.; ZHANG, Q.; YANG, Q. Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 139, p. 193–198, 2008.
253. MONIRUZZAMAN, M.; BAO, R. M.; TAKETSURU, H.; MIYANO, T. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*, v. 72, p. 280–288, 2009.
254. AMORIM, C. A.; VAN LANGENDONCKT, A.; DAVID, A.; DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Human Reproduction*, v. 24, n.1, p. 92–99, 2009.
255. CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M.; CASTRO, S. V.; LUZ, H. K.; ROSSETTO, R.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P.; COSTA, A. P. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology*, v. 76, n. 5, p. 933-941, 2011.
256. YOUM, H. W.; LEE, J. R.; LEE, J.; JEE, B. C.; SUH, C. S.; KIM, S. H. Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified –warmed ovarian tissue survival. *Human Reproduction*, v. 29, n. 4, p. 720–730, 2014.
257. NEWTON, H.; AUBARD, Y.; RUTHERFORD, A.; SHARMA, V.; GOSDEN, R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, v. 11, n. 7, p. 1487-1491, 1996.
258. OKTAY, K.; NEWTON, H.; AUBARD, Y.; SALHA, O.; GOSDEN, R. G. Cryopreservation of immature human oocyte and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertility and Sterility*, v. 69, p. 1-7, 1998.
259. SALLE, B.; LORNAGE, J.; FRANCK ,M.; ISOARD, L.; RUDIGOZ, R. C.; GUERIN, J. F. Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment. *Fertility and Sterility*, v. 70, n. 1, 124-128, 1998.
260. PAYNTER, S. J.; COOPER, A.; FULLER, B. J.; SHAW, W. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. *Cryobiology*, v. 38, p. 301–309, 1999.

261. LEDDA, S.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; NAITANA, S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. *Theriogenology*, v. 55, n. 1, p. 1359-1371, 2001.
262. ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; RAHIMI, G.; NAWROTH, F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.108, p. 186–193, 2003.
263. GOOK, D. A.; EDGAR, D. H.; STERN, C. Cryopreservation of human ovarian tissue. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 113S, p. S41–S44, 2004.
264. LUCCI, C. M.; KACINSKIS, M. A.; LOPES, L. H. R.; RUMPF, R.; BAO, S. N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology*, v. 61, p. 1101–1114, 2004.
265. RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; COSTA, S. H. F.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; LUCCI, C. M.; BÃO, S. N.; OHASHI, O. M.; FIGUEIREDO, J. R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v. 61, p. 1009–1024, 2004a.
266. RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; COSTA, S. H. F.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; LUCCI, C. M.; BÃO, S. N., OHASHI, O. M.; FIGUEIREDO, J. R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Animal Reproduction Science*, v. 84, p. 211–227, 2004b.
267. SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; SILVA, J. R. V.; MATOS, M. H. T.; LUCCI, C. M.; BAO, S. N.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Histological and ultrastructural analysis of Cryopreserved sheep preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 91, p. 249–263, 2006.
268. ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; REINSBERG, J.; MONTAG, M.; VAN DER VEN, K.; DORN, C.; ROESING, B.; VAN DER VEN, H. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of rapid and conventional freezing. *Cryobiology*, v. 55, p. 261–268, 2007.
269. AERTS, M. J.; DE CLERCQ, J. B. P.; ANDRIES, S.; LEROY, J. L. M. R.; AELST, S. V.; BOLS, P. E. J. Follicle survival and growth to antral stages in short-term murine ovarian cortical transplants after cryologic solid surface vitrification or slow-rate freezing. *Cryobiology*, v. 57, p. 163–169, 2008.
270. BORGES, E. N.; SILVA, R. C.; FUTINO, D. O.; ROCHA-JUNIOR, C. M.; AMORIM, C. A.; BÃO, S. N.; LUCCI, C. M. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*, n. 2, p. 195-200, 2009.
271. ISACHENKO, V.; LAPIDUS, I.; ISACHENKO, E.; KRIVOKHARCHENKO, A.; KREIENBERG, R.; WORIEDH, M.; BADER, M.; WEISS, J. M. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction*, v. 138, p. 319–327, 2009.
272. ZHOU, X. H.; WU, Y. J.; SHI, J.; XIA, Y. X.; ZHENG, S. S. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology*, v. 60, p. 101–105, 2010.
273. AMORIM, C. A.; DAVID, A.; DOLMANS, M. M.; CAMBONI, A.; DONNEZ, J.; VAN LANGENDONCKT, A. Impact of freezing and thawing of human ovarian tissue on follicular growth after long-term xenotransplantation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 28, n. 12, p. 1157–1165, 2011.
274. SHEIKHI, M.; HULTENBY, K.; NIKLASSON, B.; LUNDQVIST, M.; HOVATTA, O. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Human Reproduction*, v. 26, n. 3 p. 594–603, 2011.

275. LUNARDI, F. O.; ARAUJO, V. R.; FAUSTINO, L. R.; CARVALHO, A. A.; GONÇALVES, R. F. B.; BASS, C. S.; BAO, S. N.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. *Small Ruminant Research*, v. 107, n. 2-3, p. 121-130, 2012.
276. MILENKOVIC, M. GARCIA, C. D.; WALLIN, A.; BRANNSTR, M. A. Viability and function of the cryopreserved whole rat ovary: comparison between slow-freezing and vitrification. *Fertility and Sterility*, v. 97, n. 5, p. 1176-1182, 2012.
277. TING, A. Y.; YEOMAN, R. R.; CAMPOS, J. R.; LAWSON, M. S.; MULLEN, S. F.; FAHY, G. M.; ZELINSKI, M. B. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. *Human Reproduction*, v. 28, n. 5, p. 1267-1279, 2013.
278. CORDON-CARDO, C. Mutation of cell cycle regulators: biological and clinical implications for human neoplasia. *American Journal of Pathology*, v. 147, p. 545–560, 1997.
279. HOOS, A.; URIST, M. J.; STOJADINOVIC, A.; MASTORIDES, S.; DUDAS, M. E.; LEUNG, D. H. Y.; KUO, D.; BRENNAN, M. F.; LEWIS, J. J.; CORDON-CARDO, C. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *American Journal of Pathology*, v. 158, p. 1245–1251, 2001.
280. KUMAR, G. L.; RUDBECK, L. *Immunohistochemical staining methods*. 5.ed. Dako: USA, 2009, 172p.
281. CANNISTRA, S. A. Cancer of the Ovary. *The New England Journal of Medicine*, v. 51, p. 2519-2529, 2004.
282. BARAKAT, R. R.; FEDERICI, M. G.; SAIGO, P. E.; ROBSON, M. E.; OFFIT, K.; BOYD, J. Absence of premalignant histologic, molecular, or cell biologic alterations in prophylactic oophorectomy specimens from BRCA1 heterozygotes. *Cancer*, v. 89, n. 2, p. 383-390, 2000.
283. REIS C. J. F. Rastreamento e diagnóstico de neoplasias de ovário-papel dos marcadores tumorais. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 27, n. 4, p. 222-227, 2005.
284. OLIVEIRA, G. G.; FONSECA, C. A. Use of tumor markers in the diagnosis and monitoring of the treatment of cancer. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. VIII, n. 2, p. 60 – 74, 2011
285. VALENTE, V.; MASSABKI, P. S. *Tumor markers in ovarian cancer: what's new?* *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, v. 9, n. 5, p. 377-381, 2011.
286. EL-HAFEZ, A. A.; EL-HADAAD, H. A. Immunohistochemical expression and prognostic relevance of Bmi-1, a stem cell factor, in epithelial ovarian cancer. *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 18, p. 58–62, 2014.
287. SUAREZ, A.; PALACIOS, J.; BURGOS, E.; GAMALLO, C. Signet-ring stromal tumor of the ovary: a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Virchows Archiv A. Pathological Anatomy and Histopathology*, v. 422, p. 333 336, 1993.
288. GURUSINGHE, C. J.; HEALY, D. L.; JOBLING, T.; MAMERS, P.; BURGER, H. G. Inhibin and activin are demonstrable by immunohistochemistry in ovarian tumor tissue. *Gynecologic Oncology*, v. 57, p. 27–32, 1995.
289. COSTA, M. J.; WALLS, J.; AMES, P.; ROTH, L. M. Transformation in recurrent ovarian granulosa cell tumors: Ki67 (MIB-1) and p53 immunohistochemistry demonstrates a possible molecular basis for the poor histopathologic prediction of clinical behavior. *Human Pathology*, v. 27, n. 3, p. 274-281, 1996.
290. HORNY, H. P.; MARX, L.; KROBER, S.; LUTTGES, J.; KAISERLING, E.; DIETL, J. Granulosa cell tumor of the ovary. Immunohistochemical evidence of low proliferative activity and virtual absence of mutation of the p53 tumor-suppressor gene. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, v. 47, n. 2, p. 133-138, 1999.
291. WERNESS, B. A.; AFIFY, A. M.; BIELAT, K. L.; ELTABBAKH, G. H.; PIVER, M. S.; PATERSON, J. M. Altered surface and cyst epithelium of ovaries removed

- prophylactically from women with a family history of ovarian cancer. *Human Pathology*, v. 30, n. 2, 151-157, 1999.
292. COBELLIS, L.; CATALDI, P.; REIS, F. M.; DE PALO, G.; RASPAGLIESI, F.; PILOTTI, S.; ARCURI, F.; PETRAGLIA, F. Gonadal malignant germ cell tumors express immunoreactive inhibin/activin subunits. *European Journal of Endocrinology*, v. 145, p. 779–784, 2001.
 293. FUJIMOTO, T.; SAKURAGI, N.; OKUYAMA, K.; FUJINO, T.; YAMASHITA, K.; YAMASHIRO, S.; SHIMIZU, M.; FUJIMOTO, S. Histopathological prognostic factors of adult granulosa cell tumors of the ovary. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, v.80, p. 1069–1074, 2001.
 294. BALKWILL, F.; BAST JR, R. C.; BEREK, J.; CHENEVIX-TRENCH, G.; GORE, M.; HAMILTON, T.; JACOBS, I.; MILLS, G.; SOUHAMI, R.; URBAN, N.; URSULIC, S.; SMYTH, J. Current research and treatment for epithelial ovarian cancer: a position paper from the Helene Harris Memorial Trust. *European Journal of Cancer*, v. 39, p. 1818–1827, 2003.
 295. WEINBERG, L. E.; LURAIN, J. R.; SINGH, D. K.; SCHINK, J. C. Survival and reproductive outcomes in women treated for malignant ovarian germ cell tumors. *Gynecologic Oncology*, v. 121, p. 285–289, 2011.
 296. LI, J.; FADARE, O.; XIANG, L.; KONG, B.; ZHENG, W. Ovarian serous carcinoma: recent concepts on its origin and carcinogenesis *Journal of Hematology & Oncology*, v. 5, p. 8, 2012.
 297. TASSELL, R.; KENNEDY, J. P. Early follicular development and atretic changes in the ovary of the lamb- fine structure and histochemistry. *Australian Journal of Biological Sciences*, v. 33, p. 675-687, 1980.
 298. ZIMOWSKA, G.; SILHACEK, D. L.; SHAAAYA, E.; SHIRK, P. D. Immuno-Fluorescent analysis of follicular growth and development in whole ovaries of the Indianmeal Moth. *Journal of Morphology*, v. 209, p. 215-228, 1991.
 299. TEERDS; K. J.; DORRINGTON, J. H. Immunohistochemical localization of 3-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat ovary during follicular development and atresia. *Biology of Reproduction*, v. 49, p. 989-996, 1993.
 300. SASANO, H. Functional pathology of human ovarian steroidogenesis: normal cycling ovary and steroid-producing neoplasms. *Endocrinology Pathology*, v. 5, p.81-89, 1994.
 301. KAMAT, B. R.; BROWN, L. F.; MANSEAU, E. J.; SENGER, D. R.; DVORAK, H. F. Expression of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. *American Journal of Pathology*, v. 146, n. 1, p. 157-165, 1995.
 302. OKTAY, K.; SCHENKEN, R. S.; NELSON, J. S. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biology of Reproduction*, v. 53, p. 295-301, 1995.
 303. SINOWATZ, F.; AMSELGRUBER, W.; TOPFER-PETERSEN, E.; TOTZAUER, I.; CALVETE, J.; PLENDL, J. Immunocytochemical characterization of porcine zona pellucida during follicular development. *Anatomy and Embryology*, v. 191, p. 41-46, 1995.
 304. REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. *Reviews of Reproduction*, v. 1, p. 182–192, 1996.
 305. YAMAMOTO, S.; KONISHI, I.; NANBU, K.; KOMATSU, T.; MANDAI, M.; KURODA, H.; MATSUSHITA, K.; MORI, T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary. *Gynecological Endocrinology*, v. 11, n. 4, p. 223-230, 1997b.
 306. YAMAMOTO, S.; KONISHI, I.; TSURUTA, Y.; NANBU, K.; MANDAI, M.; KURODA, H.; MATSUSHITA, K.; HAMID, A. A.; YURA, Y.; MORI, T. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecological Endocrinology*, v. 11, n. 6, p. 371-381, 1997a.

307. KOBAYASHI, H.; SUN, G. A. W.; HIRASHIMA, Y.; TERAQ, T. Identification of link protein during follicle development and cumulus cell cultures in rats. *Endocrinology*, v. 140, n. 8, p. 3835-3842, 1999.
308. SUN, G. W.; KOBAYASHI, H.; TERAQ, T. Expression of Link Protein during mouse follicular development. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 47, n. 11, p. 1433-1442, 1999.
309. ZIMMERMANN, R. C.; HARTMAN, T.; KAVIC, S.; PAULI, S. A.; BOHLEN, P.; SAUER, M. V.; KITAJEWSKI, J. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *The Journal Clinical Investigation*, v. 112, n. 5, p. 659-669, 2003.
310. MAZAUD, S.; GUYOT, R.; GUIGON, C. J.; COUDOUEL, N.; MAGUERESSE-BATTISTONI, B. L.; MAGRE, S. Basal membrane remodeling during follicle histogenesis in the rat ovary: contribution of proteinases of the MMP and PA families. *Developmental Biology*, v. 277, p. 403-416, 2005.
311. TOMANEK, M.; CHRONOWSKA, E. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, v. 44, n. 4, p. 269-274, 2006.
312. BALLA, M.; ANGELOPOULOU, R.; LAVRANOS, G.; KITTAS, C. Follicular cells versus oocytes: Cell population dynamics in the developing ovary. *Tissue and Cell*, v. 40, p. 373-381, 2008.
313. MARTELLI, A.; PALMERINI, M. G.; RUSSO, V.; RINALDI, C.; BERNABO, N.; DI GIACINTO, O.; BERARDINELLI, P.; NOTTOLA, S. A.; MACCHIARELLI, G.; BARBONI, B. Blood vessel remodeling in pig ovarian follicles during the periovulatory period: an immunohistochemistry and SEM-corrosion casting study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 7, p. 72, 2009.
314. CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; ASSUNÇÃO, C. M.; CARVALHO, B. C.; BATISTA, R. I. T. P.; GARCIA, R. M. G.; VIANA, J. H. M. Follicular populations, recruitment and atresia in the ovaries of diferente strains of mice. *Reproductive Biology*, v. 12, n. 1, p. 41-55, 2011.
315. NARKWICHEAN, A.; JAYAPRAKASAN, K.; MAALOUF, W. E.; HERNANDES-MEDRANO, J. H.; PINCOTT-ALLEN, C.; CAMPBELL, B. K. Effects of dehydroepiandrosterone on in vivo ovine follicular development. *Human Reproduction*, v. 29, n. 1, p. 146-154, 2013.
316. KRISTENSEN, S. G.; ANDERSEN, K.; CLEMENT, C. A.; FRANKS, S.; HARDY, K.; ANDERSEN, C. Y. Expression of TGF-beta superfamily growth factors, their receptors, the associated SMADs and antagonists in five isolated size-matched populations of pre-antral follicles from normal human ovaries. *Molecular Human Reproduction*, v. 20, n. 4, p. 293-308, 2014.
317. SANTOS, J. M. S.; MENEZES, V. G.; BARBERINO, R. S.; MACEDO, T. J. S.; LINS, T. L. B.; GOUVEIA, B. B.; BARROS, V. R. P.; SANTOS, L. P.; GONÇALVES, R. J. S.; MATOS, M. H. T. Immunohistochemical localization of Fibroblast Growth Factor-2 in the sheep ovary and its effects on pre-antral follicle apoptosis and development *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, n. 3, p. 522-528, 2014.
318. VOS, M. C.; VAN DER WURFF, A. A.; LAST, J. T. J.; DE BOED, E. A. M.; SMEENK, J. M. J.; VAN KUPPEVELT, T. H.; MASSUGER, L. F. Immunohistochemical expression of MMP-14 and MMP-2, and MMP-2 activity during human ovarian follicular development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 12, p. 12, 2014.
319. MEEK, G. A. *Practical electron microscopy for biologists*. John Wiley and Sons: New York, 1976, 528p.
320. STEGNER, H. E.; WARTENBERG, H. H. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Eizellen des Menschen in verschiedenen Stadien der Oogenese. *Archiv für Gynaekologie*, v. 199, p.151-172, 1963.

321. LANZAVECCHIA, G.; MANGIONI, C. Etude de la structure et des constituants du follicle humain dans l'ovaire foetal I Le follicle primordial. *Journal of Microscopy*, v. 3, p. 447-464, 1964.
322. HERTIG, A. T.; ADAMS, E. C. Studies on the human oocyte and its follicle. i. ultrastructural and histochemical observations on the Primordial Follicle Stage *The Journal of Cell Biology*, v. 34, 1967.
323. NICOSIA, S. V.; EVANGELISTA, I.; BATTA, S. K. Rabbit ovarian follicles. I. Isolation technique and characterization at different stages of development. *Biology of Reproduction*, v. 13, n. 4, p. 423-447, 1975.
324. EPPIG, J. J. Mouse oocyte development *in vitro* with various culture systems. *Developmental Biology*, v. 60, p. 371-388, 1977.
325. WASSARMAN, P. M.; JOSEFOWICZ, W. J. Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *Journal of Morphology*, v. 156, n. 2, 209-235, 1978.
326. GREENWALD, G. S.; MOOR, R. M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *Journal of Reproduction & Fertility*, v. 87, p. 561-571, 1989.
327. ASSEY, R. J.; HYTTEL, P.; KANUYA, N. Oocyte structure in dominant and subordinate follicles in zebu cattle (*bos-indicus*). *Anatomy and Embryology*, v. 190, p. 461-468, 1994.
328. MOTTA, P. M.; MAKABE, S.; NAGURO, T.; CORRER, S. Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. *Archives of Histology and Cytology*, v. 57, n. 4, p. 369-394, 1994.
329. MOTTA, P. M.; NOTTOLA, S. A.; FAMILIARI, G.; MACCHIARELLI, G.; VIZZA, E.; CORRER, S. Ultrastructure of human reproduction from folliculogenesis to early embryo development. A review. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, v. 100, n. 4, p. 9-72, 1995.
330. MOTTA, P. M.; NOTTOLA, S. A.; PEREDA, J.; CROXATTO, H. B.; FAMILIARI, G. Ultrastructure of human cumulus oophorus: a transmission electron microscopic study on oviductal oocytes and fertilized eggs. *Human Reproduction*, v. 10, n. 9, p. 2361-2367, 1995.
331. MOTTA, P. M.; MAKABE, S.; NOTTOLA, S. A. The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction Update*, v. 3, n. 3, p. 281-295, 1997.
332. JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats - viability and ultrastructural investigations. *Animal Reproduction Science*, v. 44, p. 183-193, 1996.
333. FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy Embryology*, v. 195, p. 327-336, 1997.
334. LUCCI, C. M.; SILVA, R. V.; CARVALHO, C. A.; FIGUEIREDO, R.; BÁO, S. N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 41, n. 1, p. 61-69, 2001.
335. DE BRUIN, J. P.; DORLAND, M.; SPEK, E. R.; POSTHUMA, G.; VAN HAAFTEN, M.; LOOMAN, C. W. N.; TE VELDE, E. R. Ultrastructure of the resting ovarian follicle pool in healthy young women. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 1151-1160, 2002.
336. MOTTA, P. M.; NOTTOLA, S. A.; FAMILIARI, G.; MAKABE, S.; STALLONE, T.; MACCHIARELLI, G. Morphodynamics of the follicular-luteal complex during early ovarian development and reproductive life. *International Review of Cytology*, v. 223, p. 177-288, 2003.
337. DE BRUIN, J. P.; DORLAND, M.; SPEK, E. R.; POSTHUMA, G.; VAN HAAFTEN, M.; LOOMAN, C. W. N.; VELDE, E. R. T. Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 419-424, 2004.

338. KACINSKIS, M. A.; LUCCI, C. M.; LUQUE, M. C. A.; BAO, S. N. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 87, p. 45–57, 2005.
339. MAKABE, S.; NAGURO, T.; STALLONE, T. Oocyte–follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microscopy Research and Technique*, v. 69, p. 436–449, 2006.
340. SATHANANTHAN, A. H.; SELVARAJ, K.; GIRIJASHANKAR, M. L.; GANESH, v.; SELVARAJ, P.; TROUNSON, A. O. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy Research and Technique*, v. 69, p. 396–407, 2006.
341. HUTANU, D.; CRACIUN, C.; CHECIU, M.; CHECIU, I. Ultrastructural aspects of human immature oocytes. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 15, n. 3, 2010.
342. YU, S. J.; YONG, Y. H.; CUI, Y. Oocyte morphology from primordial to early tertiary follicles of Yak. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45, p. 779–785, 2010.
343. DAVOODIAN, N.; MESBAH, F.; KAFI, M. Oocyte ultrastructural characteristics in camel (*Camelus Dromedarius*) primordial to large antral follicles. *Anatomia Histologia Embryologia*, v. 40, p. 120–127, 2011.
344. SILVA, R. C.; BAO, S. N.; JIVAGO, J. L.; LUCCI, C. M. Ultrastructural characterization of porcine oocytes and adjacent follicular cells during follicle development: Lipid component evolution. *Theriogenology*, v. 76, p. 1647-1657, 2011.
345. BOROJENI, M. B.; BOROJENI, N. B.; SALEHNIA, M.; MARANDI, E.; BOROJENI, M. B. Ultrastructural changes of corpus luteum after ovarian stimulation at implantation period. *Iranian Biomedical Journal*, v. 16, n. 1, p. 33-37, 2012.
346. BLAUSTEIN, A.; SHENKER, L.; SALUJA, M. Ultrastructural demonstration of nuclear bodies in primary ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, v. 2, p. 101-108, 1974.
347. GENTON, C. Y. Ultrastructure of Clear Cell Carcinoma of the Ovary. *Virchows Archiv A. Pathological Anatomy and Histopathology*, v. 385, p. 77-91, 1979.
348. LIFSCHITZ-MERCER, B.; DAVID, R.; DHARAN, M.; CZERNOBILSKY, B. Small cell carcinoma of the ovary: an immunohistochemical and ultrastructural study with a review of the literature. *Virchows Archiv A. Pathological Anatomy and Histopathology*, v. 421, p. 263-270, 1992.
349. GUIMARÃES, G. C.; NOVIK, P. R.; GADELHA, A. P.; CRUZ, S. M.; COUDRY, R. A.; ABRÃO, F. S. Small cell carcinoma of the ovary with hypercalcemia. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 23, n. 7, p. 451-455, 2001.
350. SAITOU, M.; ISONISHI, S.; HAMADA, T.; KIYOKAWA, T.; TACHIBANA, T.; ISHIKAWA, H.; YASUDA, M. Mitochondrial ultrastructure-associated chemotherapy response in ovarian cancer. *Oncology Reports*, v. 21, p. 199-204, 2009.
351. FAZZARI, C.; FEDELE, F.; PIZZI, G.; CRISAFULLI, C.; PARISI, A.; CARUSO, R. A. Krukenberg tumour of the ovary: A Case Report with Light microscopy, immunohistochemistry and electron microscopy study. *Anticancer Research*, v. 28, p. 1417-1420, 2008.
352. YURCHENKO, O. V.; TODOR, I. N.; KHAYETSKY, I. K.; TREGUBOVA, N.; LUKIANOVA, N. Y.; CHEKHUN, V. F. Ultrastructural and some functional changes in tumor cells treated with stabilized iron oxide nanoparticles. *Experimental Oncology*, v. 32, n. 4, p. 237–242, 2010.
353. FAMILIARI, G.; CAGGIATI, A.; NOTTOLA, S. A. Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. *Human Reproduction*, v. 18, p. 2080–2087, 1993.
354. RAZ, A.; FISCH, B.; OKON, E.; FELDBERG, D.; NITKE, S.; RAANANI, H.; ABIR, R. Possible direct cytotoxicity effects of cyclophosphamide on cultured human follicles: an electron microscopy study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 19, p. 500–506, 2002.

355. BABAEI, H.; ROSHANGAR, L.; SAKHAEI, E.; ABSHENAS, J.; KHEIRANDISH, R. DEGHANI, R. Ultrastructural and morphometrical changes of mice ovaries following experimentally induced copper poisoning. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, v. 14, n. 9, 2012.
356. CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN, STEIRTEGHEM, A. C. A morphological and functional study of the effect of slow freezing followed by complete in-vitro maturation of primary mouse ovarian follicles. *Human Reproduction*, v. 11, p. 2648–2655, 1996.
357. OKTAY, K.; NUGENT, D.; NEWTON, H.; SALHA, O.; CHATTERJEE, P.; GOSDEN, R. G. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v. 67, n. 3, p. 481-486, 1997.
358. GOOK, D. A.; EDGAR, D. H.; STERN, C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2-propanediol. *Human Reproduction*, v. 14, p. 2061–2068, 1999.
359. NISOLLE, M.; CASANAS-ROUX, F.; QU, J.; MOTA, P. DONNEZ, J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertility and Sterility*, v. 74, p. 122–129, 2000.
360. ABIR, R.; FISCH, B.; NITKE, S.; OKON, E.; RAZ, A.; BEN RAFAEL, Z. Morphological study of fully and partially isolated early human follicles. *Fertility and Sterility*, v. 75, p. 141–146, 2001.
361. SALEHNIYA, M.; MOGHADAM, E. A.; VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v. 78, p. 644-645, 2002.
362. MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M. M.; VAN LANGENDONCKT, A.; DEFRERE, S.; DONNEZ, J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertility and Sterility*, v. 82, p. 1390–1394, 2004.
363. CAMBONI, A.; MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M. M.; MACCHIARELLI, G.; DONNEZ, J.; NOTTOLA, S. A. Contribution of transmission electron microscopy to the study of human ovarian tissue integrity after enzymatic isolation, cryopreservation or xenografting. *Fertility and Sterility*, v. 84, n. 1, S104, 2005.
364. FABBRI, R.; PASQUINELLI, G.; BRACONE, G.; ORRICO, C.; DI TOMASO, B.; VENTUROLI, S. Cryopreservation of human ovarian tissue. *Cell and Tissue Banking*, v. 7, p. 123–133, 2006a.
365. FABBRI, R.; PASQUINELLI, G.; BRACONE, G.; ORRICO, C.; PARADISI, L.; VENTUROLI, S. Fetal calf serum versus human serum: ultrastructural evaluation of protein support influence on human ovarian tissue cryopreservation. *Ultrastructural Pathology*, v. 30, p. 253–260, 2006b.
366. SADEU, J. C.; CORTVRINDT, R.; RON-EL, R.; KASTERSTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen–thawed human fetal ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v. 85, n. 1, p. 1130-1141, 2006.
367. HAIDARI, K.; SALEHNIYA, M.; VALOUJERDI, M. R. Ultrastructural characteristics of mouse preantral follicles isolated from vitrified and non-vitrified ovaries after in vitro maturation. *Yakhteh Medical Journal*, v. 9, n. 3, p. 184-189, 2007.
368. NOTTOLA, S. A.; CAMBONI, A.; VAN LANGENDONCKT, A.; DEMYLLE, D.; MACCHIARELLI, G.; DOLMANS, M. M.; MARTINEZ-MADRID, B.; CORRER, S.; DONNEZ, J. Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertility and Sterility*, v. 90, n. 1, p. 23-32, 2008.
369. KEROS, V.; XELLA, S.; HULTENBY, K.; PETTERSSON, K.; SHEIKHI, M.; VOLPE, A.; HREINSSON, J.; HOVATTA, O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, v. 24, n. 7 p. 1670–1683, 2009.
370. BONETTI, A.; CERVI, M.; TOMEI, F.; MARCHINI, M.; ORTOLANI, F.; MANNO, M. Ultrastructural evaluation of human metaphase II oocytes after vitrification: closed versus open devices. *Fertility and Sterility*, v. 95, n. 3, p. 928-935, 2011.
371. KIM, G. A.; KIM, H. Y.; KIM, J. W.; LEE, G.; LEE, E. ; AHN, J. Y. ; PARK, J. H.; LIM, J. M. Effectiveness of slow freezing and vitrification for long-term preservation of mouse ovarian tissue. *Theriogenology*, v. 75, p. 1045–1051, 2011.

372. ARAÚJO-LEMOS, P. F. B.; FREITAS NETO, F. M.; MELO, J. V.; MOURA, M. T.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Comparison of different cryoprotectant regimes for vitrification of ovine embryos produced in vivo. *Small Ruminant Research*, v. 119, p. 100–106, 2014.
373. HYTTEL, P.; XU, K. P.; SMITH, S.; GREVE, T. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 78, p. 615-625, 1986.
374. YU N, ROY SK. Development of primordial and prenatal follicles from undifferentiated somatic cells and oocytes in the hamster prenatal ovary *in vitro*: effect of insulin. *Biology of Reproduction*, v. 61, p. 1558-1567, 1999.
375. ZHAO, J.; DORLAND, M.; TAVERNE, M. A. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. *In vitro* culture of rat pre-antral follicles with emphasis on follicular interactions. *Molecular Reproduction and Development*, v. 55, p. 65-74, 2000.
376. SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v. 61, n. 9, p. 1691-1704, 2004.
377. MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; LOPES, C. A. P.; MARTINS, F. S.; SANTOS, K. D. B.; ROCHA, R. M. P.; SILVA, J. R. V.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Follicle Stimulating Hormone and Fibroblast Growth Factor-2 interact and promote goat primordial follicle development in vitro. *Reproduction Fertility and Development*, v. 19, p. 677-684, 2007.
378. NOTTOLA, S. A.; CECCONI, S.; BIANCHI, S.; MOTTA, C.; ROSSI, G.; CONTINENZA, M. A.; MACCHIARELLI, G. Ultrastructure of isolated mouse ovarian follicles cultured in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 9, p. 3, 2011.
379. ANDRADE, E. R.; MADDOX-HYTTEL, P.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; VIANA SILVA, J. R.; ALFIERI, A. A.; SENEDA, M. M.; FIGUEIREDO, J. R.; TONIOLLI, R. Ultrastructure of sheep primordial follicles cultured in the presence of indol acetic acid, egf, and fsh. *Veterinary medicine international*, v. 670987, 2011.
380. ROSSETTO, R.; SARAIVA, M. V. A.; SANTOS, R. R.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; CHAVES, R. N.; BRITO, I. R.; RODRIGUES, G. Q.; LIMA, I. M. T.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. *Zygote*, v. 21, p. 125–128, 2013.
381. CUNHA, E. V.; COSTA, J. J. N.; ROSSI, R. O. D. S.; SILVA, A. W. B.; PASSOS, J. R. S.; PORTELA, A. M. L. R.; PEREIRA, D. C. S. T.; DONATO, M. A. M.; CAMPELLO, C. C.; SARAIVA, M. V. A.; PEIXOTO, C. A.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. P. Phytohemagglutinin improves the development and ultrastructure of in vitro cultured goat (*Capra hircus*) preantral follicles. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 46, p. 245-252, 2013.

CAPÍTULO 2

MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA NA AVALIAÇÃO DE ESTRUTURAS OVARIANAS EM MAMÍFEROS DOMÉSTICOS

1 INTRODUÇÃO

Os ovários são constituídos de um tecido especializado complexo que apresentam duas regiões distintas, o córtex e a medula. No córtex se encontram as estruturas funcionais do órgão: folículos ovarianos, em diversos estágios de desenvolvimento e corpos lúteos, além de corpos hemorrágicos e corpos *albicans* (1;2). A medula é constituída por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e tecido conjuntivo (3). Usualmente, o córtex aparece externamente e a medula internamente; nos equídeos, no entanto, a disposição é invertida, sendo o córtex a camada interna e a medula externa (4). A visualização das estruturas funcionais do ovário pode ser útil na determinação da fase do ciclo estral, como também na identificação de patologias reprodutivas (5).

Diversas técnicas de diagnóstico por imagem têm sido empregadas na avaliação dos ovários. A radiografia (raio-X) foi a primeira ferramenta de imagem utilizada para esta finalidade. Com o crescente interesse no sucesso da reprodução animal e humana, a ultrassonografia passou a ser o instrumento de diagnóstico mais usual na avaliação de estruturas ovarianas. Essa técnica

aumentou a precisão de exames ginecológicos e possibilitou a identificação de tumores e cistos ovarianos (6-14). Com o surgimento do doppler tornou-se possível diferenciar patologias malignas ovarianas com base na observação de regiões de neovascularização (15).

No início dos anos 70 o surgimento da técnica de tomografia computadorizada trouxe perspectivas de melhoria no diagnóstico por imagem devido a algumas vantagens em relação à ultrassonografia (US) (16). Esta técnica foi aperfeiçoada e a microtomografia computadorizada (microTC) possibilitou a caracterização ainda mais informativa das estruturas ovarianas (17;18). Apesar do uso da microTC ser mais frequente na avaliação de tecidos mineralizados, como ossos e dentes (19-25), esta técnica também tem sido aplicada na observação de tecido cerebral (26-29), vasos e artérias (30-36), e no diagnóstico de patologias em diversos órgãos (24;37-41). A utilização da tomografia computadorizada no estudo ovariano, ainda que discreto, está mais direcionado à pesquisa em humanos, como na identificação de tumores (15; 42-51) e torções ovarianas (52). Outros estudos utilizaram esta técnica em poucas espécies animais (macacos: 53;54; ratos: 55).

A microTC é uma técnica não invasiva que detecta diferenças de densidade menores que 1% e possibilita a visualização de estruturas em escala micrométrica (56), o que é favorável em estudos de reprodução. As estruturas funcionais ovarianas podem ser visualizadas tanto na TC como na US. Ao contrário da US, a TC permite reconstruir o tecido ovariano em 3D, em vários planos de corte e em tempo real, tornando-se vantajosa no estudo de patologias ovarianas (57-60). Além disso, a TC é uma técnica rápida e não invasiva, assim como a US, mas, diferente desta, apresenta resolução

compatível com a histologia (61). Técnicas de alta resolução, como a histologia, a microscopia eletrônica de transmissão e a microscopia confocal de varredura a laser são invasivas, pois dependem da biópsia do tecido a ser avaliado (62). Por este e outros motivos, a tomografia computadorizada apresenta potencial para auxiliar estudos em reprodução animal. Assim, este estudo é uma investigação pioneira no uso da microTC para explorar e comparar estruturas ovarianas em diversas espécies de mamíferos domésticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ovários inteiros de rata (n=2), cadela (n=2), gata (n=1) e vaca (n=2) e hemi-ovários de porca (n=3), égua (n=3) e jumenta (n=1) oriundos de animais adultos, hígidos e não prenhes. Os ovários de cadela, gata, égua e jumenta foram provenientes de ovariohisterectomia eletiva, os de porca e vaca proveniente de abatedouro certificado, e o de rata oriundo do biotério da Universidade de Brasília.

O material foi fixado em solução de Carnoy durante a noite (égua, jumenta, porca e vaca) ou durante 8 horas (cadela, gata e rata) em temperatura ambiente. Após a fixação, o material foi submerso em álcool 70% e mantido sob refrigeração (4°C).

2.1 Microtomografia computadorizada (microTC)

Os ovários e hemi-ovários fixados foram submersos em uma solução de álcool (70%) com iodo (1%) durante 24 horas antes do escaneamento para obtenção de contraste. A microTC foi realizada com o aparelho de microtomografia *Skyscan 1076* (Skyscan, Aartselaar, Belgium), no qual os parâmetros utilizados foram: 100 kV, 100 mA, resolução de 9 μ m, filtro de alumínio de 1 mm. A reconstrução bidimensional das imagens foi realizada com o software *NRecon* (V 1.6.9, versão 64 bit com aceleração GPU) e para as análises tridimensionais das imagens reconstruídas foram utilizados os softwares *CTvox* (V 1.5.0, versão 64 bit) e *DataViewer* (1.5.0 versão 32 bit). Todos os softwares utilizados são desenvolvidos pela *Skyscan* (Kontich, Belgium).

2.2 Histologia

A técnica de histologia foi utilizada como procedimento controle e de confirmação das estruturas ovarianas identificadas na microTC. Após o escaneamento, os ovários/hemi-ovários foram transferidos individualmente para solução de álcool 70% e seguiram para os procedimentos de desidratação em soluções crescentes de álcool (80%, 90% e 100%), diafanização em xilol, infiltração e inclusão em parafina (Paraplast, Sigma). De cada ovário foram realizados 5 cortes da região central do órgão na espessura de 5 μ m que foram montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE).

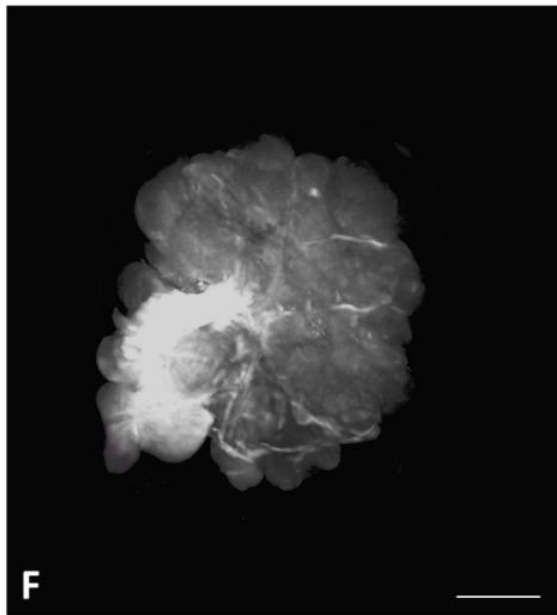
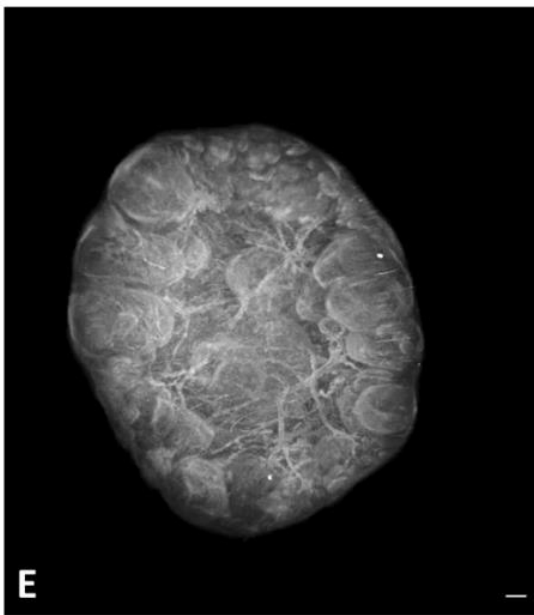
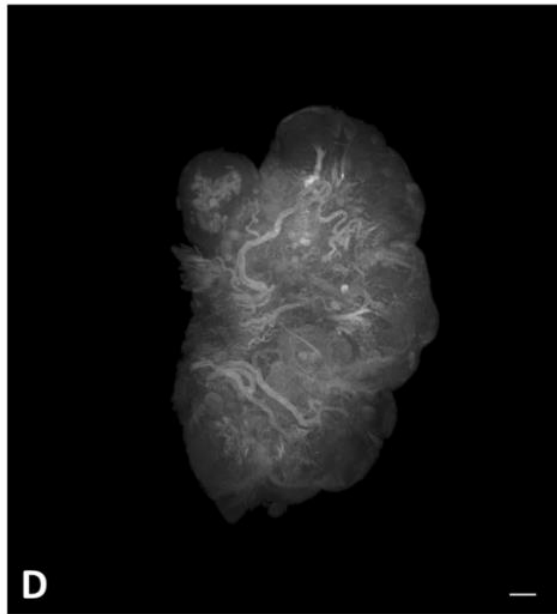
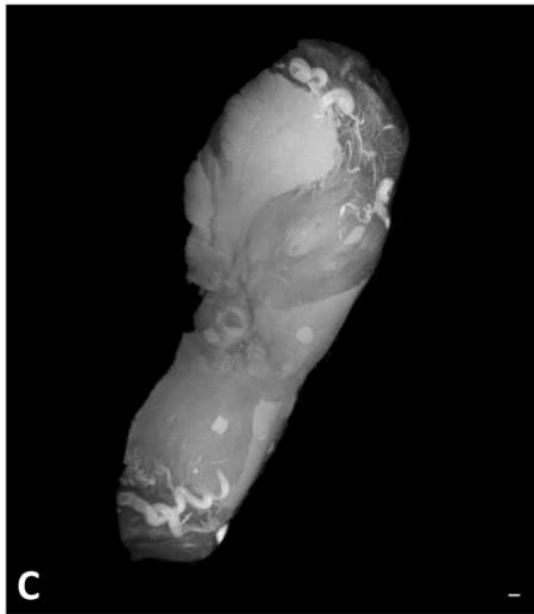
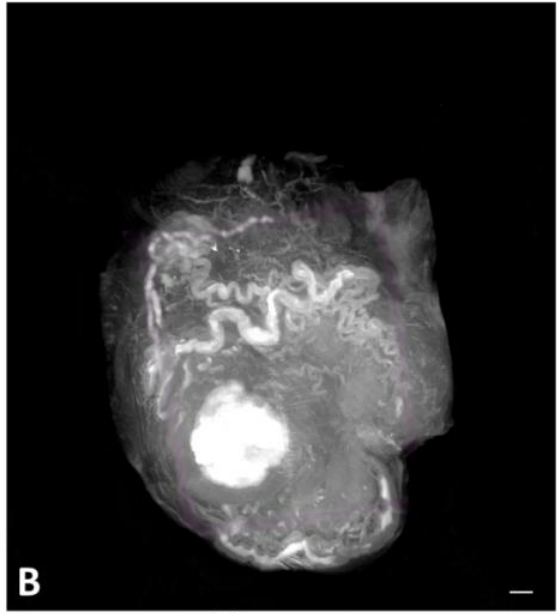
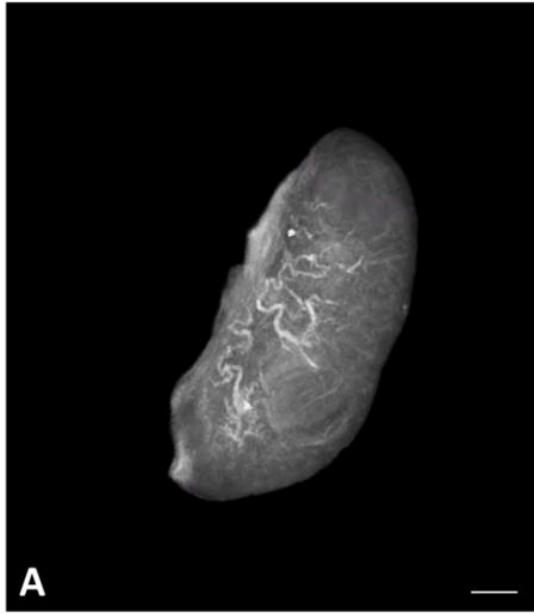
As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz (Leica DM1000, Leica, Wetzlar, Germany) e fotografadas com câmera digital (Leica DFC280, Leica,

Wetzlar, Germany) acopladas ao software Leica Application SuitZe (versão 2.7.0 R1 Copyright 2003-2007, Leica Microsystems, Switzerland). As imagens de todos os campos microscópicos foram documentadas com objetiva de 4x e unidas com o uso do software Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporated-Versão 13.0x64, USA) para reconstrução do corte histológico total.

3 RESULTADOS

Em todas as sete espécies estudadas as imagens selecionadas da região tomográfica se apresentava idêntica ou bastante semelhante à imagem reconstruída do corte histológico. Foi possível observar as estruturas ovarianas hipercaptantes devido à utilização do contraste (iodo). Foi verificado que os vasos sanguíneos calibrosos, mais presentes na região medular, se ramificam em vasos mais delgados que penetram no córtex. No ovário de gata (Figura 1A), jumenta (Figura 1B) e égua (Figura 1C) os vasos sanguíneos se encontram em maior concentração na região medular, enquanto que nos ovários de porca (Figura 1D), vaca (Figura 1E) e rata (Figura 1F) os vasos estão dispersos em todo o tecido ovariano. Nos ovários de jumenta (Figura 1B) e de égua (Figura 1C) é notável a inversão das regiões ovarianas em relação às outras espécies, com a região cortical situada internamente e a medular na periferia.

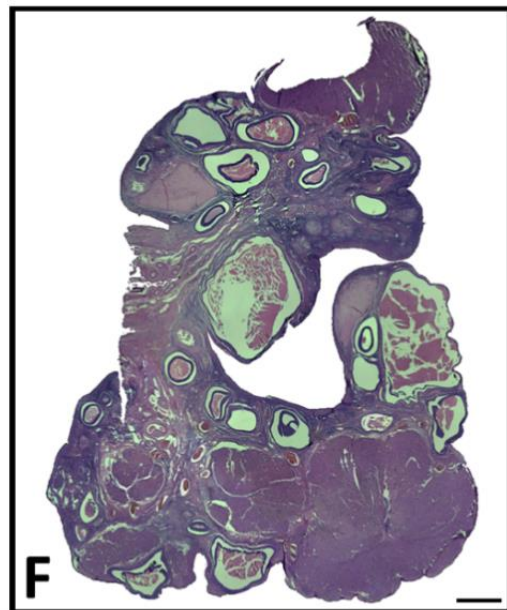
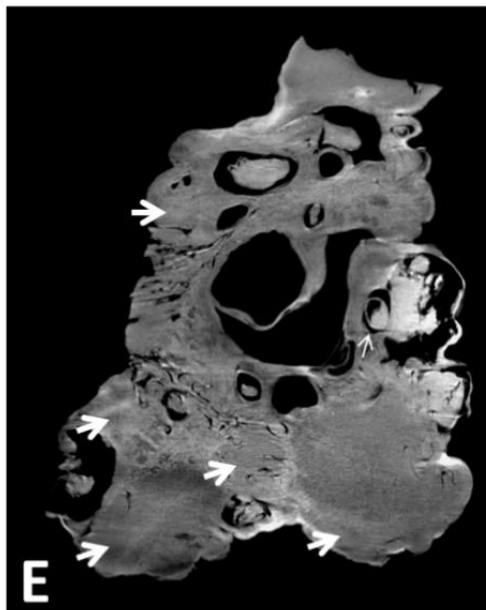
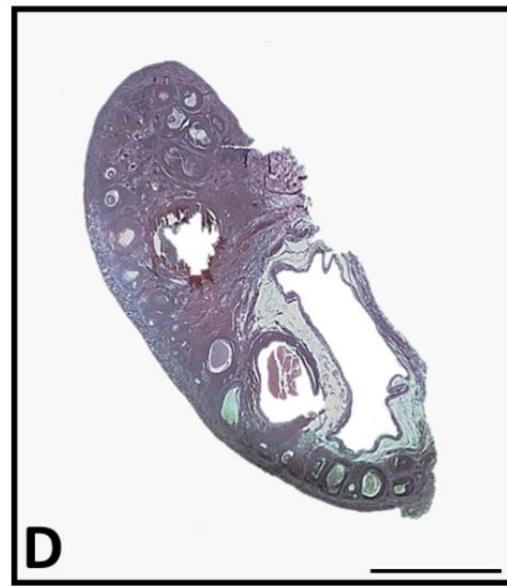
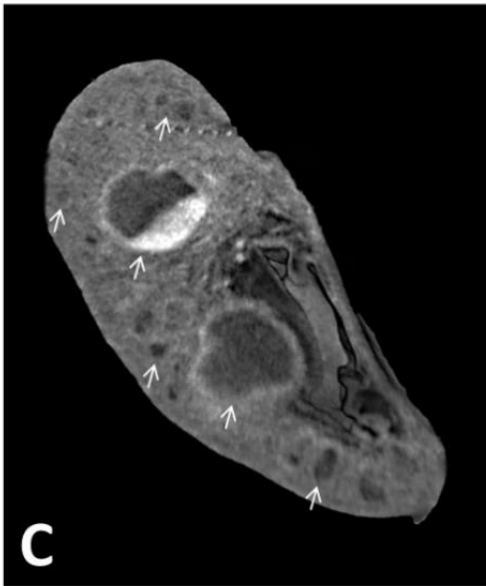
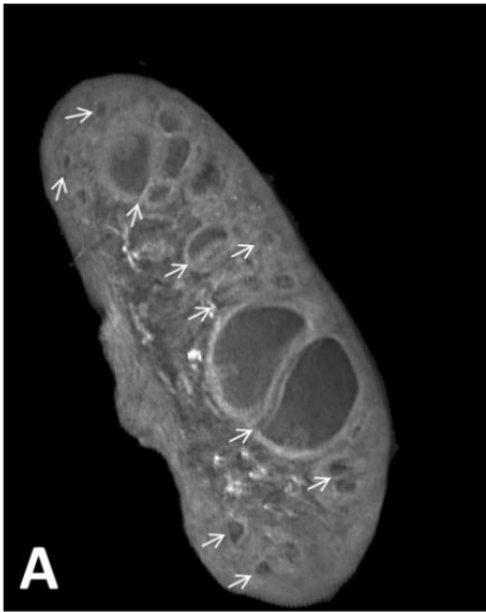
Figura 1. Imagens reconstruídas de microtomografia dos ovários evidenciando vasos sanguíneos. **A:** gata. **B:** jumenta. **C:** égua. **D:** porca. **E:** vaca. **F:** rata. Note a maior concentração de vasos sanguíneos na região medular nas figuras A, B e C e a dispersão dos vasos nas figuras D, E e F. As áreas claras nos ovários de jumenta (B) e rata (F) revelam grande concentração de substância contrastante. Barras = 2,5 mm.



Com exceção dos ovários de égua e jumenta, a observação dos folículos antrais e corpos lúteos foi bastante nítida pela microTC, o que foi confirmado pela histologia (Figura 2). Nos ovários de gata (Figuras 2A e 2B), cadela (Figuras 2C e 2D) e porca (Figuras 2E e 2F), bem como de vaca (Figura 3) e rata, os folículos antrais encontram-se dispersos no córtex ovariano.

A microTC permite visualizar o órgão em 3D, como pode ser visto na Figura 3 que apresenta os três planos de corte do ovário de vaca. Esta ferramenta possibilitou maior detalhamento das estruturas ovarianas. De um modo geral, o estroma hiperdenso auxiliou na distinção de folículos antrais, corpos lúteos e as regiões de córtex e medula ovarianas (Figura 3), em função da maior absorção da substância contrastante.

Figura 2. Imagens reconstruídas de microtomografia e cortes histológicos de ovários. **A; B:** gata (Barra = 2 mm). **C; D:** cadela (Barra = 2 mm). **E; F:** porca (Barra = 1,4 mm). Foram selecionadas imagens da região tomográfica idêntica ou bastante semelhante à imagem reconstruída do corte histológico. Setas finas: folículos antrais, setas grossas: corpos lúteos.



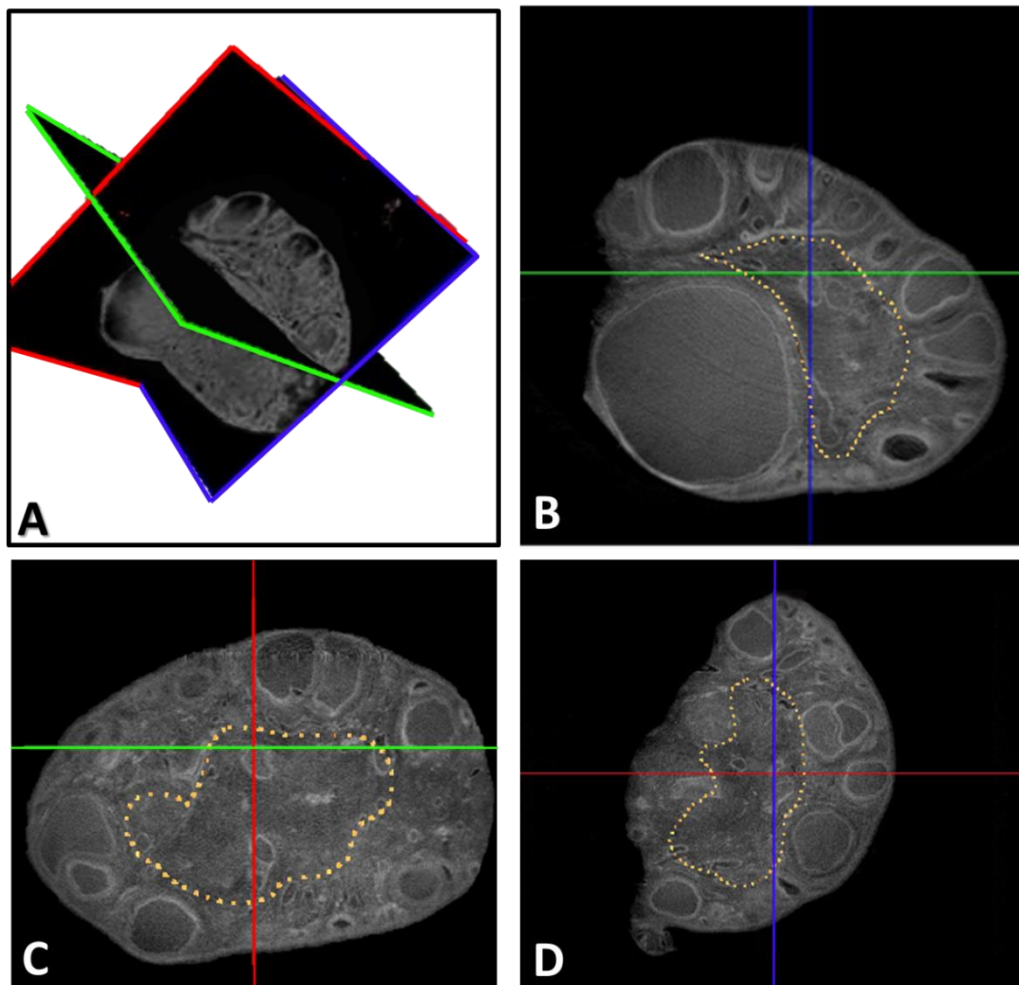


Figura 3. Imagens reconstruídas em 3D de microtomografia de ovário de vaca mostrando córtex, medula e folículos antrais bem definidos. **A:** Imagem da reconstrução em 3D onde podem ser observados todos os planos de corte: sagital (vermelho), axial (azul) e coronal (verde). **B:** Imagem bidimensional do plano de corte sagital. **C:** Imagem bidimensional do plano de corte axial. **D:** Imagem bidimensional do plano de corte coronal. Região de medula destacada pela linha pontilhada. Observar a grande quantidade de folículos antrais dispersos no córtex.

Com a reconstrução das imagens em 3D e análise das diversas secções virtuais, foi possível visualizar ovócitos dentro de alguns folículos antrais em ovário de gata (Figura 4).

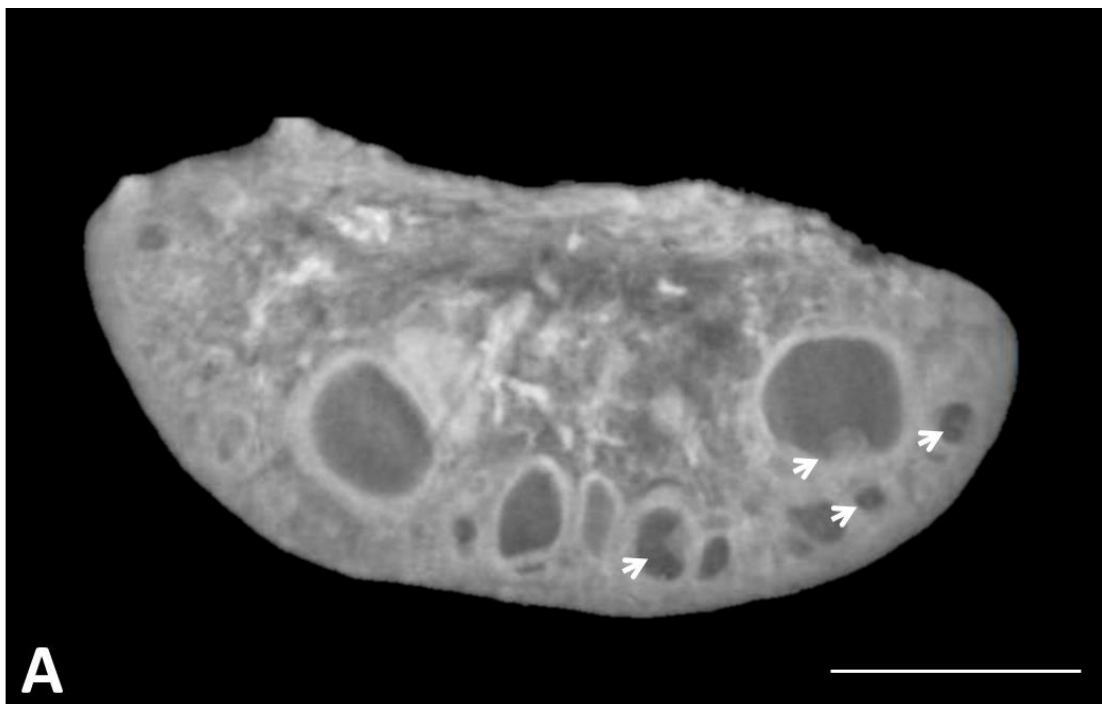


Figura 4. Imagem de microTC de ovário de gata mostrando ovócitos dentro de folículos antrais (setas brancas). Barra = 2 mm.

A utilização de um dispositivo do software *DataViewer*, que permite alterar o contraste das estruturas, possibilitou maior qualidade na visualização das imagens, com destaque para os corpos lúteos (Figura 5). Corpos lúteos se encontraram em maior quantidade do que folículos antrais nos ovários de égua (Figura 5A), porca (Figura 5B) e rata (Figura 5C), provavelmente devido à fase do ciclo estral em que se encontravam os animais.

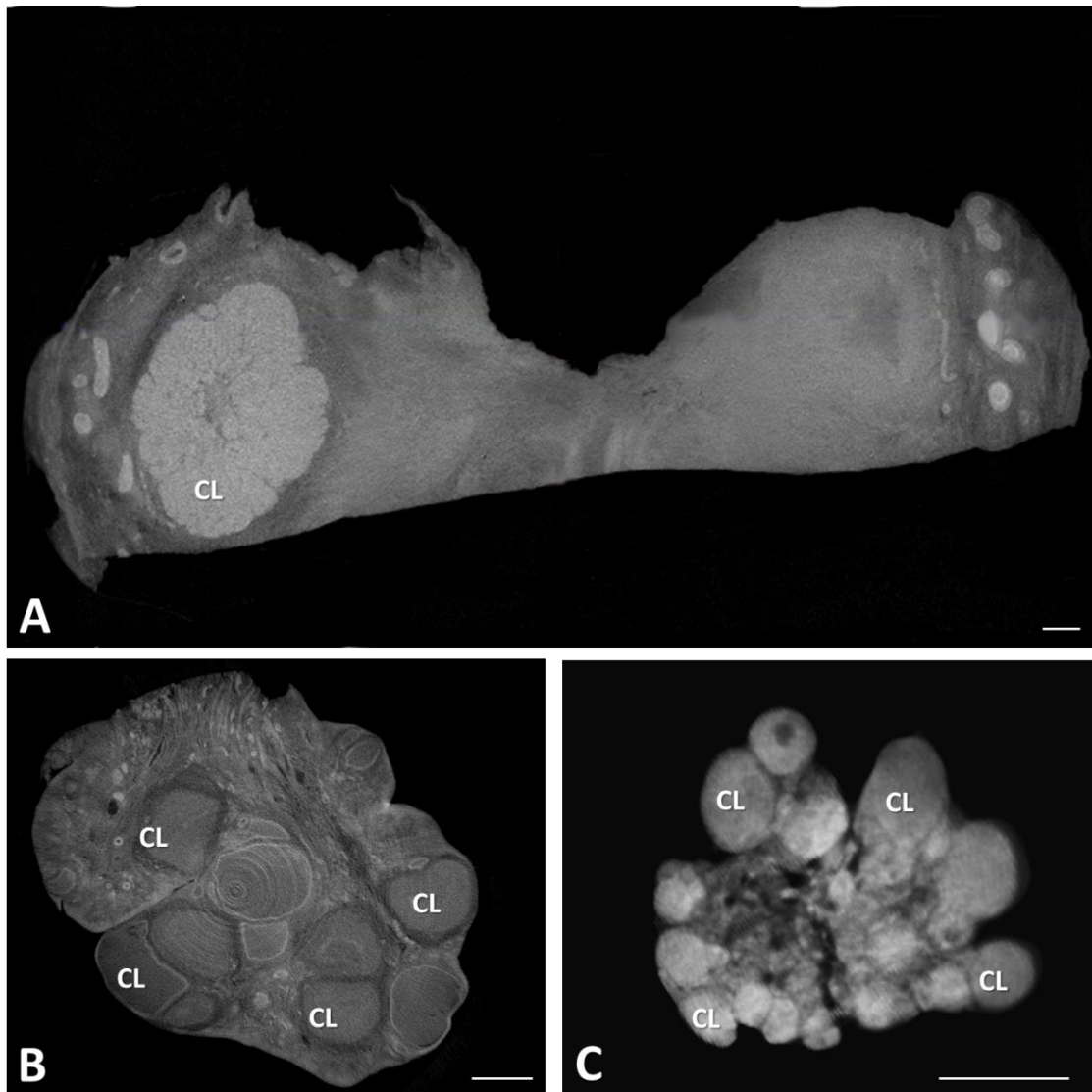


Figura 5. Imagem de microtomografia utilizando dispositivo de alteração de contraste que possibilitou evidenciar corpos lúteos. **A:** égua. **B:** porca. **C:** rata. CL: corpos lúteos. Barras = 2,5 mm.

Não foi observado nenhum folículo pré-antral com o uso da microTC, embora tenha sido confirmada a presença dessas estruturas nos ovários de gata, cadela, rata, porca e vaca com a técnica de histologia. Todavia, no ovário de gata, o dispositivo de coloração do software *DataViewer* utilizado possibilitou situar as regiões pela histologia onde havia maior concentração de folículos pré-antrais (Figura 6). Além disso, essa ferramenta potencializou a diferenciação das regiões de córtex e medula.

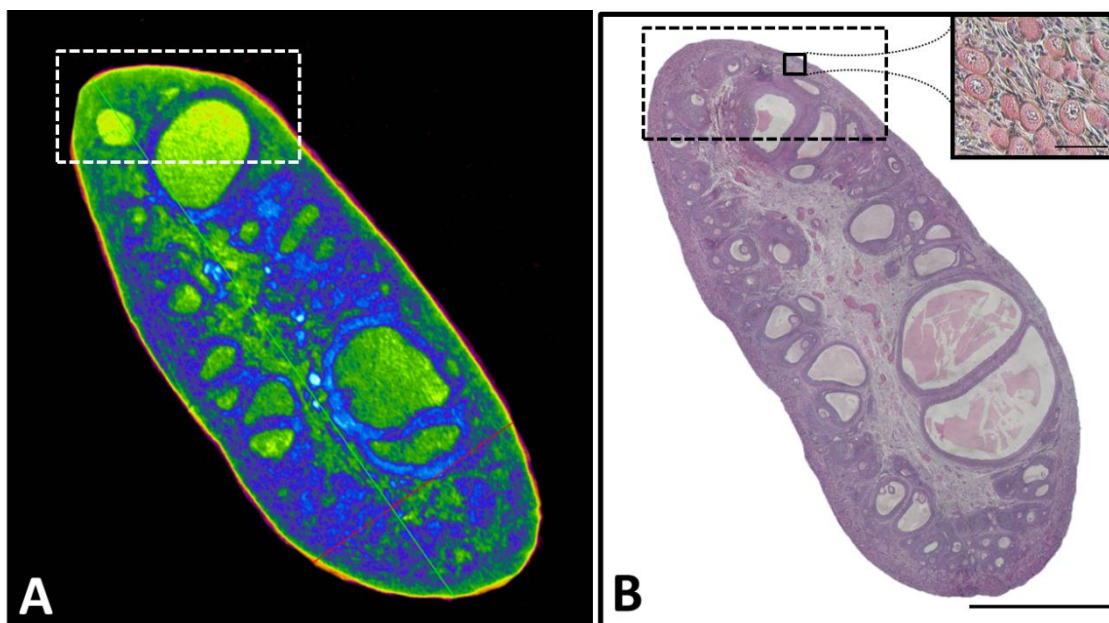


Figura 6. Imagem de microtomografia utilizando o dispositivo de coloração do software *DataViewer* (A) e corte histológico reconstruído (B) de ovário de gata (Barra = 2 mm). Em destaque (retângulos tracejados) a região contendo folículos pré-antrais realçada pela coloração verde na imagem de microTC. *Insert:* área ampliada contendo inúmeros folículos pré-antrais (Barra = 50 μ m).

4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho que demonstrou o uso da microTC para explorar e comparar estruturas ovarianas em diversas espécies de mamíferos domésticos. Nas sete espécies estudadas foi possível distinguir as regiões de córtex e medula, bem como identificar em algumas delas folículos antrais e corpos lúteos e observar a distribuição dos vasos sanguíneos.

Esta técnica comprovou a viabilidade da análise morfológica de vasos sanguíneos de médio e grande calibre nos ovários, entretanto, a visualização de capilares é limitada pela resolução do sistema de imagem (35). Neste estudo, a utilização de um dispositivo do software *DataViewer* tornou possível alterar o contraste das estruturas e encontrar maior definição das imagens. As ferramentas de contraste e coloração do software são dinâmicas e de fácil acessibilidade aos usuários do equipamento. Assim como demonstrado em

pesquisas com ovários humanos, a microTC é uma técnica viável e promissora para estudos da angiologia ovariana em mamíferos domésticos, principalmente para a avaliação de vasos sanguíneos no período periovulatório (63), que é marcado pela intensa neovascularização perifolicular (64;65).

Os resultados do presente estudo confirmaram que o contraste por imersão em iodo resultou na boa visualização dos ovários pela técnica de microTC, contudo, apesar de nosso estudo ter sido realizado *in vitro*, já foi demonstrado que o contraste endovenoso é um método assertivo para a identificação de vasos sanguíneos (57;58;61;62;66;67), o que demonstra a possibilidade da realização destas análises *in vivo*. A utilização de outros tipos de contraste também é possível, como iohexol, sulfato de bário, entre outros a base de iodo (60;63;68-71) e novos estudos estão sendo realizados com contrastes de nanopartículas (40).

A investigação *in vivo* minuciosa da rede vascular requer uma técnica de imagem de alta resolução, sendo a tomografia computadorizada apropriada para este tipo de análise (35). A ultrassonografia transvaginal continua sendo o principal método de avaliação das estruturas pélvicas e, com o uso de doppler, a neovascularização tem sido observada como indicador do período fértil em mulheres (14;72;73), visto que esta técnica é um instrumento auxiliar de alta sensibilidade nesse tipo de investigação (65;74). Todavia, as vias transvaginal e a transretal, que proporcionam melhor visualização, tem seu uso limitado em algumas espécies animais. Este é o caso de animais de pequeno porte, como cadelas, gatas e porcas, dentre outros, e até mulheres, quando estas apresentam integridade himenal (15). A alternativa de utilizar a ultrassonografia transabdominal para mensurar folículos antrais em macacas mostrou-se

limitada (75). A difícil visualização das regiões periféricas dos ovários é resultado da sobreposição dos ossos pélvicos, presença de conteúdo fecal e gases nos intestinos (54). Além disso, a vantagem que a ultrassonografia associada a doppler colorido apresenta, como possibilitar a visualização da perfusão sanguínea no ovário (35;76-78), é questionável pelo fato das avaliações ovarianas serem restritas apenas à superfície do tecido.

O nosso trabalho mostrou ser possível a observação de estruturas ovarianas, como folículos antrais e corpos lúteos, pela técnica de microTC em todas as espécies avaliadas. As estruturas identificadas nas imagens tomográficas foram confirmadas por cortes histológicos. Outro estudo comparou imagens de ovários obtidas com a técnica de tomografia computadorizada e histologia em primatas e confirmou a presença de folículos antrais (53;54) o que sugere a possibilidade do uso desta técnica para diagnósticos de patologias relacionadas a esta estrutura. Em humanos, a visualização de folículos antrais por tomografia computadorizada já foi utilizada para o diagnóstico de ovários císticos e policísticos (50;57;59;79). Com isso, a técnica de ultrassonografia pode vir a ser complementada ou substituída pela tomografia computadorizada. Trabalhos demonstraram ser possível observar e até contar folículos antrais com as técnicas de ultrassonografia transvaginal convencional (80;81) ou em 3D (82-85). Contrariamente a isto, outros estudos mostraram que estas técnicas apresentam baixa contagem de folículos, mesmo quando em 3D (86-87).

Em nosso estudo, foi possível ainda observar ovócitos dentro de folículos antrais com a técnica de microTC, o que merece maiores investigações e pode ser útil para aplicações futuras. Folículos pré-antrais não puderam ser

visualizados no presente trabalho com esta técnica, provavelmente pela característica hipodensa e ausência de líquido nessas microestruturas, além de seu pequeno tamanho. No entanto, com o uso de ferramentas do software *DataViewer*, que possui dispositivo de coloração passível de evidenciar certas estruturas, foi possível identificar regiões do córtex ovariano onde havia grande concentração de folículos pré-antrais em ovários de gatas. É possível que características intrínsecas desta espécie, como a concentração dos folículos pré-antrais em áreas bem definidas e a organização do estroma, tenham contribuído para este resultado. É possível ainda que esta ferramenta tenha ressaltado a região dos folículos pré-antrais em função da área estar permeada por grande quantidade de ovócitos, que, por se tratarem de células com grande citoplasma, conferem menor densidade à região, assim como foi destacada a região medular que também é menos densa. Mais estudos precisam ser realizados neste sentido.

Corpos lúteos foram observados em ovários de rata, porca, égua e jumenta, mas ausentes em gata, cadela e vaca. A ausência de algumas estruturas como corpos lúteos em ovários de gata, cadela e vaca e folículos antrais em égua e jumenta pode ser devido à fase do ciclo estral em que se encontravam esses animais. A presença de corpos lúteos (47) e *albicans* haviam sido detectadas por outros estudos (55)

Os resultados dessa pesquisa abrem perspectivas para estudos não invasivos de caracterização morfológica de ovários em animais domésticos, como tem sido desenvolvido em humanos (45;57;58;79;88), e também para o acompanhamento de procedimentos de reprodução assistida, visto que os resultados podem vir a ser extrapolados para o uso da técnica *in vivo* com a

avaliação dos ovários *in loco*. Destacam-se avaliações *in vivo*, nos quais a sobreposição de ossos, gases, fezes, entre outros, limitam a ultrassonografia e também casos em que a técnica invasiva é impossibilitada ou indesejável. Outra aplicação promissora é no estudo da população de folículos e do desenvolvimento folicular, na qual uma imagem 3D pode tornar o diagnóstico mais prático e acurado na avaliação do tecido ovariano, mesmo em estruturas bastante homogêneas (89).

A técnica de microTC apresentou resolução suficiente para a observação de estruturas ovarianas, tornando possível identificar com precisão folículos antrais, inclusive com visualização do ovócito, corpos lúteos e outras estruturas de interesse. Todos os achados tomográficos foram confirmados com a técnica de histologia e a popularização desta técnica dependerá do barateamento do procedimento, que se apresenta promissor para a pesquisa científica e a rotina clínica ligada à reprodução humana e animal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01- KOERING, M. J. Cyclic changes in ovarian morphology during the menstrual cycle in *Macaca mulatta*. *American Journal of Anatomy*, v. 126, p. 73-101, 1969.
- 02- GURAYA, S. S. *Biology of ovarian follicles in mammals*. New York: Springer-Verlag. 1985. p.3-14.
- 03- BANKS, J. W. *Histologia veterinária aplicada*. 2.ed. São Paulo: Manole. 1992.
- 04- GINTHER, O. J. *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*. 2ed. Cross Plains: Equiservices Publishing. 1992.
- 05- GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G. *Patologia e Clínica da Reprodução dos Animais Mamíferos Domésticos*. 1.ed. São Paulo: Livraria Varela. 2005. 551p.
- 06- PIERSON, R. A.; GINTHER J. O. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*, v. 21, p. 495-504, 1984.
- 07- PRATER, P. E.; SHIRES, M.; COLEY, R. B. Diagnostic aids for ovarian neoplasia: serologic interpretation and ultrasonography. *Veterinary Medicine*, v. 83, p. 1273–1276, 1988.
- 08- SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. *Biology of Reproduction*, v. 39, n. 2, p. 308- 317, 1988.
- 09- RIBADU, A. Y.; WARD, W. R.; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. *Veterinary Record*, v. 135, n. 19, p. 452-457, 1994.
- 10- KAWATE, N.; INABA, T.; MORI, J. Changes in plasma concentrations of gonadotropins and steroid hormones during the formation of bovine follicular cysts induced by the administration of ACTH. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 58, p. 141–144, 1996.
- 11- JOU, P.; BUCKRELL, B. C.; LIPTRAP, R. M.; SUMMERLEE, A. J. S.; JOHNSON, W. H. Evaluation of the effect of GnRH on follicular ovarian cysts in dairy cows using transrectal ultrasonography. *Theriogenology*, v. 52, n. 5, p. 923- 937, 1999.
- 12- RIBADU, A. Y.; NAKAO, T. Bovine reproductive ultrasonography: a review. *Journal of Reproduction and Development*, v.45, n.1, p.13-28, 1999.
- 13- NOBLE, K. M.; TEBBLE, J. E.; HARVEY, D.; DOBSON, H. Ultrasonography and hormone profiles of persistent ovarian follicles (cysts) induced with low doses of progesterone in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 120, n. 2, p. 361-366, 2000.
- 14- VLAISAVLJEVIC, V.; DOSEN, M. Clinical applications of ultrasound in assessment of follicle development and growth. *Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, v. 1, n. 2, p. 50-63, 2007.
- 15- GIORDANO, L. A.; GIORDANO, M. V.; SILVA, R. O. Tumores anexiais na adolescência. *Adolescência & Saúde*, v.6, p. 48-52, 2009.
- 16- HOUNSFIELD, G. N. Computerized transverse axial scanning (tomography). Part 1. Description of system. *The British Journal of Radiology*, v. 46, n. 552, p. 1016–1022, 1973.
- 17- GULDBERG, R. E, BALLOCK, R. T.; BOYAN, B. D.; DUVALL, C. L.; LIN, A. S.; NAGARAJA, S.; OEST, M.; PHILLIPS, J.; PORTER, B. D.; ROBERTSON, G.; TAYLOR, W. R. Analyzing bone, blood vessels, and biomaterials with microcomputed tomography. *IEEE Engeneering in Medicine and Biology Magazine*, v. 22, n. 5, p. 77– 83, 2003.
- 18- GULDBERG, R. E.; LIN, A. S.; COLEMAN, R.; ROBERTSON, G.; DUVALL C. Microcomputed tomography imaging of skeletal development and growth. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*, v. 72, n. 3, p. 250–259, 2004.
- 19- DAVIS, G. R.; WONG, F. S. L. X-ray microtomography of bones and teeth. *Physiological Measurement*, v. 17, p. 121–146, 1996.

- 20- HUBSCHER, W.; BARBAKOW, F.; PETERS, O. A. Root-canal preparation with FlexMaster: canal shapes analysed by micro-computed tomography. *International Endodontic Journal*, v. 36, p. 740–747, 2003.
- 21- POSTNOV, A.; VINOGRADOV, A.; VAN DYCK, D.; SAVELIEV, S. V.; DE CLERCK, N. M. Quantitative analysis of bone mineral content by X-ray microtomography. *Physiological Measurement*, v. 24, p. 165–178, 2003.
- 22- WAARSING, J. H.; DAY, J. S.; VAN DER LINDEN, J. C.; EDERVEEN, A. G.; SPANJERS, C.; DE CLERCK, N.; SASOV, A.; WEINANS, H. Detecting and tracking local changes in the tibiae of individual rats : a novel method to analyze longitudinal in vivo I-CT data. *Bone*, v. 34, n.1, p. 163–169, 2004.
- 23- MARECHAL, M.; LUYTEN, F.; NIJS, J.; POSTNOV, A.; SCHEPERS, E.; VAN STEENBERGHE, D. Histomorphometry and microcomputed tomography of bone augmentation under a titanium membrane. *Clinical Oral Implants Research*, v. 16, n. 6, p. 708–714, 2006.
- 24- NEVEN, E.; DAUWE, S.; DE BROE, M. E.; D'HAESE, P. C.; PERSY, V. Endochondral bone formation is involved in media calcification in rats and in men. *Kidney International*, v. 72, n. 5, p. 574–581, 2007.
- 25- MARKVART, M.; DARVANN, T. A.; LARSEN, P.; DALSTRA, M.; KREIBORG, S.; BJORN DAL, L. Micro-CT analyses of apical enlargement and molar root canal complexity. *International Endodontic Journal*, v. 45, p. 273–281, 2012.
- 26- SWANSON, R. A.; MORTON, M. T.; TSAO-WU, G.; SAVALOS, R. A.; DAVIDSON, C.; SHARP, F. R. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 10, p. 290-293, 1990.
- 27- KURAOKA, M.; FURUTA, T.; MATSUWAKI, T.; OMATSU, T.; ISHII, Y.; KYUWA, S.; YOSHIKAWA, Y. Direct experimental occlusion of the distal middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice. *Experimental Animals*, v. 58, p. 19-29, 2009.
- 28- LANGHEINRICH, A. C.; YENIGUEN, M.; OSTENDORF, A.; MARHOFFER, S.; KAMPSCHULTE, M.; BACHMANN, G.; STOLZ, E.; GERRIETS, T. Evaluation of the middle cerebral artery occlusion techniques in the rat by in-vitro 3-dimensional micro- and nano computed tomography. *BMC Neurology*, v. 10, p. 36, 2010.
- 29- DOBRIVOJEVIC, M.; BOHACEK, I.; ERJAVEK, I.; GORUP, D.; GAJOVIC, S. Computed microtomography visualization and quantification of mouse ischemic brain lesion by nonionic radio contrast agents. *Croatian Medical Journal*, v. 54, p. 3-11, 2013.
- 30- KANTOR, B.; JORGENSEN, S. M.; LUND, P. E.; CHMELIK, M. S.; REYES, D. A.; RITMAN, E. L. Cryostatic micro-computed tomography imaging of arterial wall perfusion. *Scanning*, v. 24, p. 186–190, 2002.
- 31- LANGHEINRICH, A.; BOHLE, R.; GRESCHUS, S.; HACKSTEIN, G.; VON GERLACH, S.; RAU, W.; HOELSCHERMANN, H. Atherosclerotic lesions at micro-CT: feasibility for analysis of coronary artery wall in autopsy specimens. *Radiology*, v. 231, p. 675–681, 2004.
- 32- PERSY V, POSTNOV A, NEVEN E, DAMS G, DE BROE M, DHAESE P, DE CLERCK NM (2006) Detection of vascular calcifications by high resolution X-ray microtomography in living rats with chronic renal failure. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 26, p. 2110–2116, 2006.
- 33- BARRETO, M.; SCHOENHAGEN, P.; NAIR, A.; AMATANGELO, S.; MILITE, M.; OBUCHOWSKI, N.; LIEBER, M.; HALLIBURTON, S. Potential of dual-energy computed tomography to characterize atherosclerotic plaque: ex vivo assessment of human coronary arteries in comparison to histology. *Journal of Cardiovascular Computed Tomography*, v. 2, p. 234–242, 2008.
- 34- POSTNOV, A. A.; D'HAESE, E. P. C.; NEVEN, E. E.; DE CLERCK, E. N. M.; PERSY, E. V. P. Possibilities and limits of X-ray microtomography for in vivo and ex vivo detection of vascular calcifications. *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, v. 25, p. 615–624, 2009.

- 35- NEBULONI, L.; KUHN, G. A.; VOGEL, J.; MULLER, R. A novel in vivo vascular imaging approach for hierarchical quantification of vasculature using contrast enhanced Micro-Computed Tomography. *Plos One*, v. 9, n. 1, p. e86562, 2014.
- 36- DEBBAUT, C.; SEGERS, P.; CORNILLIE, P.; CASTELEYN, C.; DIERICK, M.; LALEMAN, W.; MONBALIU, D. Analyzing the human liver vascular architecture by combining vascular corrosion casting and micro-CT scanning: a feasibility study. *Journal of Anatomy*, v. 224, n. 4, p. 509-517, 2014.
- 37- DE CLERCK, N. M.; MEURRENS, K.; WEILER, H.; VAN DYCK, D.; VANHOUTTE, G.; TERPSTRA, P.; POSTNOV, A. A. High resolution X-ray microtomography for the detection of lung tumors in living mice. *Neoplasia*, v. 6, p. 374–379, 2004.
- 38- POSTNOV, A.; MEURRENS, K.; WEILER, H.; VANDYCKD, X. U. H.; TERPSTRA, P.; DE CLERCK, N. M. In vivo assessment of emphysema in mice by high resolution X-ray microtomography. *Journal of Microscopy*, v. 220, p. 70–75, 2005.
- 39- SAMEI, E.; SAUNDERS, R. S.; BADEA, C. T.; GHAGHADA, K. B.; HEDLUND, L. W.; QI, Y.; YUAN, H.; BENTLEY, R. C.; MUKUNDAN JR, S. Micro-CT imaging of breast tumors in rodents using a liposomal, nanoparticle contrast agent. *International Journal of Nanomedicine*, v. 4, p. 277 – 282, 2009.
- 40- ASHTON, J. R.; CLARK, D. P.; MODING, E. J.; GHAGHADA, K.; KIRSCH, D. G.; WEST, J. L.; BADEA, C. T. Dual-Energy Micro-CT Functional Imaging of Primary Lung Cancer in Mice Using Gold and Iodine Nanoparticle Contrast Agents: A Validation Study. *Plos One*, v.9, p. e88129, 2014.
- 41- KLINE, T. L.; KNUDSEN, B. E.; ANDERSON, J. L.; VERCNOCKE, A. J.; JORGENSEN, S. M.; RITMAN, E. L. Anatomy of hepatic arteriolo-portal venular shunts evaluated by 3D micro-CT. *Journal of Anatomy*, v. 224, n. 6, p. 724-731, 2014.
- 42- SAWYER, R. W.; VICK, C. W.; WALSH, J. W.; MCCLURE, P. H. Computed tomography of benign ovarian masses. *Journal of Computer Assisted Tomography*, v. 9, n. 4, p. 784-789, 1985.
- 43- SEMELKA, R. C.; LAWRENCE, P. H.; SHOENUT, J. P.; HEYWOOD, M.; KROEKER, M. A.; LOTOCKI, R. Primary ovarian cancer: prospective comparison of contrast-enhanced CT and pre-and postcontrast, fat-suppressed MR imaging, with histologic correlation. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, v. 3, n. 1, p. 99-106, 1993.
- 44- HAMM, B. Computerized tomography and MR tomography in diagnosis of ovarian tumors. *Radiologe*, v. 34, n. 7, p. 362-369, 1994.
- 45- MACSWEENEY, J. E.; KING, D. M. Computed tomography, diagnosis, staging and follow-up of pure granulosa cell tumour of the ovary. *Clinical Radiology*, v. 49, n. 4, p. 241-245, 1994.
- 46- FOSHAGER, M. C.; HOOD, L. L.; WALSH, J. W. Masses Simulating Gynecologic Diseases at CT and MR Imaging. *RadioGraphics*, v. 16, p. 1085-1099, 1996.
- 47- RIEBER, A.; NÜSSLE, K.; STÖHR, I.; GRAB, D.; FENCHEL, S.; KREIENBERG, R.; RESKE, S. N.; BRAMBS, H. J. Preoperative diagnosis of ovarian tumors with MR imaging: comparison with transvaginal sonography, positron emission tomography, and histologic findings. *American Journal of Roentgenology*, v. 177, p. 123–129, 2001.
- 48 KUMAR, P.; REHANI, M. M.; KUMAR, L.; SHARMA, R.; BHATLA, N.; SINGH, R.; SUNDARAM, K. R. Potential of CT-scan based tumor volume as CR a response indicator in chemotherapy of advanced epithelial ovarian cancer. *Medical Science Monitor*, v. 8, n. 10, p. CR667-674, 2002.
- 49- MAKHIJA, S.; HOWDEN, N.; EDWARDS, R.; KELLEY, J.; TOWNSEND, D. W.; MELTZER, C. C. Positron Emission tomography/computed tomography imaging for the detection of recurrent ovarian and fallopian tube carcinoma: A Retrospective Review. *Gynecologic Oncology*, v. 85, p. 53–58, 2002.
- 50- SHAABAN, A.; REZVANI, M. Ovarian cancer: detection and radiologic staging. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 52, n. 1, p. 73–93, 2009.
- 51- WANG, T.; YANG, Y.; WANG, X.; SANDERS, M.; BREWER, M.; ZHU, Q. In: Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XVII,

- 3, 2013, California. *Proceedings of Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XVII*, p. 857124, 2013.
- 52- FEBRONIO, E. M.; NUNES, T. F.; CARDIA, P. P.; D'IPPOLITO, G. Torção ovariana: ensaio iconográfico com enfoque em achados de ressonância magnética e tomografia computadorizada. *Radiologia Brasileira*, v. 45, n. 4, p. 225–229, 2012.
- 53- JONES, J. C.; APPT, S. E.; BOURLAND, J. D.; HOYER, P. B.; CLARKSON, T. B.; KAPLAN, J. R. Multidetector computed tomographic morphology of ovaries in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 46, n. 5, p. 54-63, 2007.
- 54- JONES, J. C.; APPT, S. E.; WERRE, S. R.; TAN, J. C.; KAPLAN, J. R. Validation of multi-detector computed tomography as a non-invasive method for measuring ovarian volume in macaques (*Macaca fascicularis*). *American Journal of Primatology*, v. 72, n. 6, p. 530-538, 2010.
- 55- HARIRI, L. P.; LIEBMANN, E. R.; MARION, S. L.; HOYER, P. B.; DAVIS, J. R.; BREWER, M. A.; BARTON, J. K. Simultaneous optical coherence tomography and laser induced fluorescence imaging in rat model of ovarian carcinogenesis. *Cancer Biology & Therapy*, v. 10, n. 5, p. 1-10, 2010.
- 56- BONTRAGER, K. L. *Tratado de técnica radiológica e base anatômica*. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, 2003, 805p.
- 57- FOSHAGER, M. C.; WALSH, J. W. CT anatomy of the female pelvis: a second look. *Radiographics*, v. 14 n. 1, 51-66, 1994.
- 58- ROZENBLIT, A. M.; RICCI, Z. J.; TUVIA, J.; AMIS JR, E. S. Incompetent and dilated ovarian veins: a common CT finding in asymptomatic parous women. *American Journal of Roentgenology*, v. 176, n. 1, p. 119-122, 2001.
- 59- SAKSOUK, F. A.; JOHNSON, S. C. recognition of the ovaries and ovarian origin of pelvic masses with CT. *RadioGraphics*, v. 24, p. S133–S146, 2004.
- 60- YOSHIDA, Y.; KUROKAWA, T.; TSUJIKAWA, T.; OKAZAWA, H.; KOTSUJI, F. Positron emission tomography in ovarian cancer: 18F-deoxy-glucose and 16α-18F-fluoro-17β-estradiol PET. *Journal of Ovarian Research*, v. 2; p. 7-16, 2009.
- 61- METSCHER, B. D. MicroCT for developmental biology: a versatile tool for high-contrast 3D imaging at histological resolutions. *Developmental Dynamics*, v. 238, p. 632–640, 2009.
- 62- HANDSCHUH, S.; BAEUMLER, N.; SCHWAHA, T.; RUTHENSTEINER, B. A correlative approach for combining microCT, light and transmission electron microscopy in a single 3D scenario. *Frontiers in Zoology*, v. 10, p. 44, 2013.
- 63- GREGOR, T.; KOCHOVA, P.; EBERLOVA, L.; NEDOROST, L.; PROSECKA, E.; LISKA, V.; MIRKA, H.; KACHLIK, D.; PIRNER, I.; ZIMMERMANN, P.; KRALICKOVA, A.; KRALICKOVA, M.; TONAR, Z. *Correlating Micro-CT imaging with quantitative histology*. In: Injury and Skeletal Biomechanics. Croatia: Intech. 2012. p. 173-196.
- 64- REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. *Reviews of Reproduction*, v. 1, n. 3, p. 182-192, 1996.
- 65- GINTHER, O. J.; RAKESH, H. B.; HOFFMAN, M. M. Blood flow to follicles and CL during development of the periovulatory follicular wave in heifers. *Theriogenology*, in press, 2014.
- 66- KITAJIMA, K.; MURAKAMI, K.; YAMASAKI, E.; KAJI, Y.; FUKASAWA, I.; INABA, N.; SUGIMURA, K. Diagnostic accuracy of integrated FDG-PET/contrast-enhanced CT in staging ovarian cancer: comparison with enhanced CT. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 35, n. 10, p. 1912-1920, 2008.
- 67- METSCHER, B. D. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiology*, v. 9, p.11, 2009.
- 68- CUNHA, L. C.; OLIVEIRA, R. B.; AZEREDO, F. S.; VALADARES, M. C. Contrastes baritados: a toxicologia experimental como ferramenta no estabelecimento de nexos

- causal de intoxicação maciça por bário. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n. 2, p. 68-74, 2006.
- 69- NIN, C. S.; MARCHIORI, E.; IRION, K. L.; PALUDO, A. O.; ALVES, G. R. T.; HOCHHEGGER, D. R.; HOCHHEGGER, B. Estudo radiográfico com ingestão de bário na rotina clínica: um estudo prospectivo em pacientes com tosse crônica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 39, n. 6, p. 686-691, 2013.
- 70- PINHO, K. E. P.; GEWEHR, P. M.; SILVA, C. W. P.; BARISON, A.; TILLY JÚNIOR, J. G.; SOBOLL, D. S. Evaluation of contrast media submitted to ionizing radiation. *Radiologia Brasileira*, v. 42, n. 5, p. 309-313, 2009.
- 71- YEE, J.; WEINSTEIN, S.; MORGAN, T.; ALORE, P.; ASLAM, R. Advances in CT colonography for colorectal cancer screening and diagnosis. *Journal of Cancer*, v. 4, p. 200-209, 2013.
- 72- ARDAENS, Y.; GOUGEON, A.; LEFEBVRE, C.; THOMAS, P.; LEROY, M.; LEROY, J. L.; DEWAILLY, D. Contribution of ovarian and uterine color Doppler in medically assisted reproduction techniques (ART). *Gynecologie Obstetrique & Fertilité*, v. 30, n. 9, p. 663-672, 2002.
- 73- BRANNSTROM, M.; ZACKRISSON, U.; HAGSTROM, H.; JOSEFSSON, B.; HELLBERG, P.; GRANBERG, S.; COLLINS, W.; BOURNE, T. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. *Fertility and Sterility*, v. 69, p. 435-442, 1998.
- 74- AYRES, H.; MINGOTI, G. Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 36, n. 3, p. 174-180, 2012.
- 75- MORGAN, P. M.; HUTZ, R. J.; KRAUS, E. M.; CORMIE, J. A.; DIERSCHKE, D. J.; BAVISTER, B. D. Evaluation of ultrasonography for monitoring follicular growth in rhesus monkeys. *Theriogenology*, v. 27, p. 769-780, 1987.
- 76- ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 127-140, 2004.
- 77- BERGERON, L. H.; NYKAMP, S. G.; BRISSON, B. A.; MADAN, P.; GARTLEY, C. J. An evaluation of B-mode and color Doppler ultrasonography for detecting periovulatory events in the bitch. *Theriogenology*, v. 79, p. 274-283, 2013.
- 78- COUTINHO, L. N.; DE BRITO, M. S. B.; MONTEIRO, F. O. B.; ANDRADE, R. S.; CONCEIÇÃO, M. E. B.; FELICIANO, M. R.; CASTRO, P. H. G.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. W. R. Analysis of follicular events in owl monkeys (*Aotus azarai infulatus*) using B-mode and Doppler ultrasound. *Theriogenology*, v. 80, p. 99-103, 2013.
- 79- OCCHIPINTI, K. A.; FRANKEL, S. D.; HRICAK, H. The ovary. Computed tomography and magnetic resonance imaging. *Radiology Clinics of North America*, v.31, n. 5, p. 1115-1132, 1993.
- 80- HSIEH, Y. Y.; CHANG, C. C.; TSAI, H. D. Antral follicle counting in predicting the retrieved oocyte number after ovarian hyperstimulation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 18, p. 320-324, 2001.
- 81- NG, E. H.; TANG, O. S.; CHAN, C. C.; HO, P. C. Ovarian stromal blood flow in the prediction of ovarian response during in vitro fertilization treatment. *Human Reproduction*, v. 20, p. 3147-3151, 2005.
- 82- SCHEFFER, G. J.; BROEKMANS, F. J.; BANCSI, L. F.; HABBEMA, J. D.; LOOMAN, C. W.; TE VELDE, E. R. Quantitative transvaginal two- and three-dimensional sonography of the ovaries: reproducibility of antral follicle counts. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 20, p. 270-275, 2002.
- 83- KUPESIC, S.; KURJAK, A.; BJELOS, D.; VUJISIC, S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertility and Sterility*, v. 79, p. 190-197, 2003.

- 84- NG, E. H.; TANG, O. S.; CHAN, C. C.; HO, P. C. Ovarian stromal vascularity is not predictive of ovarian response and pregnancy. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 12, p. 43–49, 2006.
- 85- RAINE-FENNING, N. J.; LAM, P. M. Assessment of ovarian reserve using the inversionmode. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 27, p. 104–106, 2006.
- 86- JAYAPRAKASAN, K.; HILWAH, N.; KENDALL, N. R.; HOPKISSON, J. F.; CAMPBELL, B. K.; JOHNSON, I. R.; RAINE-FENNING, N. J. Does 3D ultrasound offer any advantage in the pretreatment assessment of ovarian reserve and prediction of outcome after assisted reproduction treatment? *Human Reproduction*, v. 22, n. 7, p. 1932–1941, 2007.
- 87- JAYAPRAKASAN, K.; WALKER, K. F.; CLEWES, J. S.; JOHNSON, I. R.; RAINE-FENNING, N. J. The interobserver reliability of off-line antral follicle counts made from stored three-dimensional ultrasound data: a comparative study of different measurement techniques. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 29, p. 335–341, 2007.
- 88- RIGSBY, C. K.; SIEGEL, M. J. CT appearance of pediatric ovaries and uterus. *Journal of Computer Assisted Tomography*, v. 18, n. 1, p. 72-76, 1994.
- 89- PAULUS, M. J.; GLEASON, S. S.; KENNEL, S. J.; HUNSICKER, P. R.; JOHNSON, D. K. High resolution X-ray computed tomography: an emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia*, v. 2, p. 62-70, 2000.

CAPÍTULO 3

ULTRAESTRUTURA DE OVÓCITOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM MAMÍFEROS DOMÉSTICOS

1 INTRODUÇÃO

No momento do nascimento, as fêmeas mamíferas apresentam dezenas de milhares de ovócitos. A região do córtex ovariano é marcada pelos inúmeros folículos ali presentes, considerados unidades funcionais do ovário que se mostram em diferentes estágios de desenvolvimento (1;2). Os folículos são classificados de acordo com o tamanho, tipo e a quantidade e morfologia das células da granulosa, além da dependência, ou não, de hormônios gonadotróficos. São denominados folículos antrais ou pré-antrais, dependendo do início da formação da cavidade antral. Folículos que ainda não apresentam cavidade antral (pré-antrais) são geralmente classificados em primordiais, primários ou secundários (3).

Na fase antral a maioria dos folículos sofre degeneração por atresia (4), tendo em vista que somente alguns poucos folículos atingem a fase pré-ovulatória, mediante estímulo de gonadotrofinas. Assim, os folículos são regulados por hormônios endócrinos e parácrinos (5;6) e seu completo

desenvolvimento culmina na ovulação. Este fenômeno é marcado pela liberação do complexo *cumulus*-ovócito, competente para ser fertilizado.

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para compreender a regulação hormonal no desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios. Proporcionalmente, o número de pesquisas com foco no desenvolvimento dos folículos ovarianos em estágios iniciais de desenvolvimento é bastante limitado (7-9).

O complexo processo de desenvolvimento folicular e ovocitário é marcado por alterações fisiológicas e ultraestruturais. Nesta revisão, são descritas algumas alterações morfológicas que ocorrem durante o crescimento folicular e ovocitário, assim como a diferenciação entre algumas espécies mamíferas. Com especial atenção aos folículos pré-antrais, ressalta-se a importância de avançar na compreensão acerca da fisiologia das células germinativas femininas.

2 ORIGEM E ESTABELECIMENTO DE FOLÍCULOS OVARIANOS

As células germinativas originam um grupo de células germinativas primordiais, derivadas da massa celular interna do blastocisto em desenvolvimento (10). Estas células germinativas primordiais surgem no alantoide e migram para a endoderma e crista genital (11). Durante sua migração, as células germinativas sofrem divisão por mitose e aumentam em quantidade (12). A proliferação do epitélio celômico e a condensação concomitante do mesênquima levam à formação de um edema, denominado crista genital (13). Inicialmente, a crista genital não contém células germinativas primordiais, que nesse momento ainda estão localizadas no epitélio do saco

vitelino, próximo da base do alantoide. A migração das células germinativas primordiais atinge as cristas genitais por meio de movimentos ameboides (13).

Uma vez estabelecidas no ovário em desenvolvimento, as células germinativas primordiais, em plena proliferação, se diferenciam em ovogônias (12). A população de ovogônias se expande por meio de uma série de divisões mitóticas até que as células entrem em processo de meiose e se tornem ovócitos primários (14;15). Assim, o número máximo de células germinativas femininas é atingido no período de transição entre mitose e meiose (16).

Embora Johnson e colaboradores (17) tenham demonstrado que as células germinativas primordiais estão presentes no epitélio do ovário de indivíduos adultos, superficialmente situadas, ainda há controvérsia se a reserva de ovócitos é mesmo renovável (18). As primeiras ovogônias que vão sofrer divisão meiótica estão localizadas nas zonas mais internas do córtex ovariano, sendo que o sentido da onda de desenvolvimento meiótico ocorre de dentro para fora. Em humanos e em grandes mamíferos, fetos no terço final da gestação já possuem ovários com células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento (10). Aglomerados de células germinativas são formados de ovogônias rodeadas por células somáticas que são as precursoras das células da granulosa (12;19).

Em algumas fêmeas mamíferas, como a vaca, ovelha e búfala (20), a foliculogênese inicia-se antes do nascimento. Em camundongas, ratas e hamsters (21;22) a foliculogênese tem início somente após o nascimento. Neste momento, todas as células germinativas dos ovários são representadas por ovócitos primários. Os ovócitos permanecerão no estágio primário até a chegada da puberdade, quando grupos de folículos serão sistematicamente

recrutados para ovulação, a cada ciclo estral (10). Mesmo antes do nascimento, alguns ovócitos já entrarão em apoptose. Esse fenômeno reduz o número de folículos ovarianos e as fêmeas nascem com um número muito menor de ovócitos que o número máximo alcançado durante a vida fetal (23).

O estoque de folículos pré-antrais é bastante variável entre espécies (24), sendo estimado em 70.576 em bovinos *Bos indicus* (25) e 89.577 em bovinos *Bos Taurus* (26), 19.819 em búfalas (27), 75.642 em ovelhas (28), 37.646 em cabras (29), 402.000 em seres humanos (30), 106.071 em macacos-prego (*Cebus apella*) (31), 37.853 em gatas domésticas (32), 210.000 em porcas (33) e 47.900 em cadelas domésticas (34). Diariamente um grande número de folículos primordiais é ativado, células da granulosa proliferam e ovócitos iniciam desenvolvimento no ovário de fêmeas mamíferas (35). A ativação de folículos primordiais inicia uma série de alterações morfológicas, caracterizando o surgimento dos folículos primários e secundários (ainda pré-antrais) e dos folículos terciários e pré-ovulatórios (antrais) (36). Estas modificações podem ser observadas pelo diâmetro do folículo e do ovócito e pelo incremento no número de células da granulosa (Tabela 1). Inúmeras alterações fisiológicas e ultraestruturais ocorrerão no folículo e no ovócito e essas modificações podem divergir significativamente entre as espécies mamíferas.

Tabela 1. Diferenças no diâmetro folicular, no ovócito e número das células da granulosa em diversas espécies. PL: folículo primordial, PR: folículo primário, S: folículo secundário.

Espécie /Referência	Diâmetro Folicular (μm)			Diâmetro do ovócito (μm)			Número médio de células da granulosa		
	PL	PR	S	PL	PR	S	PL	PR	S
Vaca [41]	36,0	48,5	88,4	28,1	31,7	43,8	7,0	15,0	62,0
Búfala [46]	35,0	41,8	53,3	24,9	26,9	29,4	4-8	8-20	-
Ovelha [103]	40,8	75,2	128,5	34,6	52,1	72,9	16,0	128,0	637,0
Caprino[51]	20,0	24,4	44,2	15,9	17,3	24,5	6,0	11,0	31,0
Gata [32]	28,3	41,0	74,6	23,1	30,1	40,8	7,0	13,0	46,0
Cadela [34]	27,5	42,6	101,6	21,7	27,8	48,0	6,0	15,0	62,0
Mulher [104]	35,4	41,9	77,2	32,1	32,2	47,8	13,0	52,0	360,0
Porca [42]	33,8	40,4	84,5	26,0	27,3	39,1	5,0	8,0	50,0

3 ESTRUTURA DOS FOLÍCULOS PRIMORDIAIS E ATIVAÇÃO

Os folículos primordiais são caracterizados por um ovócito quiescente, (no estágio de prófase I da meiose) cercado por uma única camada de células da granulosa achatadas. Estes folículos primordiais constituem a reserva ovariana, da qual sairão comprometidos com o desenvolvimento folicular (37).

Os ovócitos quiescentes são ovoides ou esféricos, com citoplasma homogêneo. O núcleo pode apresentar posição centralizada ou excêntrica, no interior dos ovócitos na maioria das espécies (Figura 1A e 1B). O núcleo é envolvido por uma membrana lisa (38;39) e normalmente a cromatina encontra-se condensada em um ou dois nucléolos (Figura 1C) (39-42).

Na maioria das espécies, o citoplasma dos ovócitos de folículos primordiais exhibe organelas próximas ao núcleo ou organelas uniformemente

dispersas (Figura 1A e 1B). As organelas mais abundantes são as mitocôndrias com formato arredondado (Figura 1B) (41), que são a forma imatura desta organela, que passará a apresentar um formato alongado quando madura (43). A presença de mitocôndrias imaturas condiz com os folículos primordiais que contém ovócitos quiescentes e não requerem quantidade significativa de energia sua manutenção (41). Na espécie suína, uma abundante e dispersa população de mitocôndrias é evidente nos ovócitos de folículos primordiais, com uma extensa rede de retículo endoplasmático permeando o citoplasma (44). Em fêmeas bovinas, os ovócitos de folículos primordiais apresentam mitocôndrias arredondadas abundantes com pequeno número de cristas periféricas (41). Em bovídeos selvagens observam-se algumas mitocôndrias com formato de capuz (“hooded”) (39).

Além de mitocôndrias, o ooplasma do folículo primordial contém gotas lipídicas, retículo endoplasmático, algumas cisternas de Golgi, polirribossomos e poucas vesículas (43). Em felinos selvagens o retículo endoplasmático apresenta-se pouco desenvolvido e a observação de complexos de Golgi é pouco comum (45). No ooplasma de ovócitos de búfalas, observa-se uma região delimitada por um retículo endoplasmático liso bastante desenvolvido (46). Em bovinos selvagens (39) e porcas (42) os polirribossomos são observados na superfície do retículo endoplasmático rugoso, distribuídos por todo o ooplasma.

Os ovócitos de todos os mamíferos contêm lipídios, sendo que a abundância e a característica lipídica variam entre as espécies. Especialmente em porcas, as gotas lipídicas são abundantes nos ovócitos desde a fase de folículos primordiais, sendo apresentadas como pequenas estruturas

arredondadas e escuras (Figura 1A) (42). Essas gotas lipídicas são consideradas como fonte de energia (47). Na maioria das espécies, é comum que o retículo endoplasmático, as mitocôndrias e as gotículas lipídicas estejam associados entre si (Figura 1D) (43).

Esta associação permite a transmissão eficiente de sinais de cálcio citosólico para a mitocôndria, permitindo a ativação do metabolismo mitocondrial e um incremento na oferta de ATP para a bomba de cálcio no retículo endoplasmático (48;49). Benhard e Rouiller (50) afirmaram que se trata de uma inter-relação fisiológica, na qual lipídios fornecem matéria prima para as mitocôndrias produzirem ATP para um ciclo de crescimento e atividade do retículo endoplasmático. À medida que o folículo se desenvolve, ocorre um aumento no número destas unidades metabólicas no ooplasma, o que sugere um aumento no metabolismo do ovócito (27).

Em cabras, búfalas e ovelhas, muitas vesículas estão espalhadas por todo o citoplasma e apresentam diferentes elétrons-densidades, o que pode significar diferentes conteúdos (46;51;52). Em folículos primordiais, as células da granulosa são pequenas e têm um núcleo relativamente grande que corresponde ao formato da célula, apresentando aglomerados de cromatina condensada e não condensada (41). Em cabras, as células da granulosa apresentam baixa densidade de organelas citoplasmáticas (51). Em búfalas se observam figuras mielínicas (46), resultado da digestão de estruturas velhas ou não funcionais (53).

De modo geral, não há junções especializadas entre as células da granulosa ou entre estas e o ovócito. Neste estágio de desenvolvimento folicular, qualquer substância é incorporada ao ovócito por endocitose, ou por

meio de difusão, quando há contato íntimo entre as membranas das células da granulosa e o ovócito. Este fenômeno é observado pela presença de um grande número de “*coated pits*” no citoplasma cortical de ovócitos de folículos primordiais de bovino (Figura 1E) (40;41;54;55) e outras espécies (39;51).

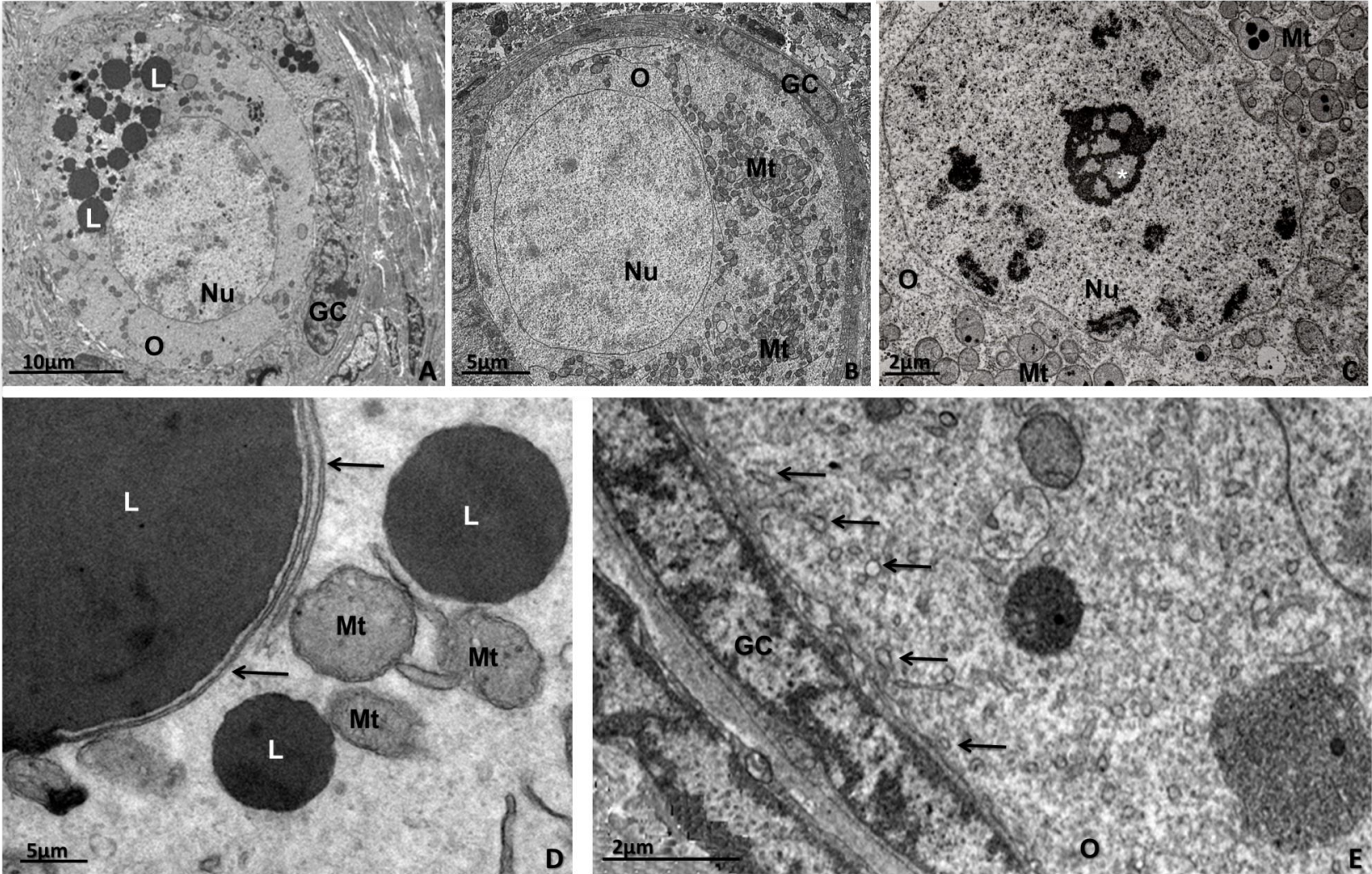
O início do crescimento e a transição do folículo primordial para o estágio primário se inicia com a ativação de folículos primordiais. A partir disso os folículos se tornam comprometidos e o crescimento folicular prossegue até que o folículo ovule ou sofra atresia (37;56). A ativação folicular ocorre apenas em um pequeno número de folículos a cada ciclo estral (57), sendo o entendimento dos fatores responsáveis pelo desencadeamento do desenvolvimento folicular um dos maiores gargalos para a compreensão da foliculogênese.

As alterações clássicas que caracterizam o desenvolvimento inicial são a diferenciação e proliferação das células da granulosa e a expansão do ovócito: no folículo primário as células da granulosa se tornam cuboides e mais numerosas (2;58). Além disso, em vacas (2) e búfalas (46), após a ativação folicular, o ovócito sofre expansão e as proteínas da zona pelúcida segregam entre o ovócito em desenvolvimento e as células da granulosa. Em algumas espécies, incluindo ratos (59), camundongos (11), hamsters (60), porquinhos da índia (61), coelhos (62), macacos (63), humanos (64;65), ovelhas (52), gatos (32), e gatos selvagens (45) a zona pelúcida é bastante evidente na fase de folículo primário.

De modo geral, a maioria das características ultraestruturais do ooplasma, de suas organelas e inclusões de folículos primários, é semelhante às descritas nos folículos primordiais. A maior parte das mitocôndrias ainda se encontra

arredondadas, embora mitocôndrias alongadas e em divisão já são observadas e irão se tornar cada vez mais frequentes (43).

Figura 1. Micrografias de folículos primordiais. **A:** Folículo de porca com núcleo central e gotas lipídicas na região lateral do ovócito. **B:** Folículo de cadela com núcleo periférico. Observar a abundância de mitocôndrias arredondadas espalhadas de maneira homogênea no ooplasma. **C:** Folículo de vaca com nucléolo no núcleo do ovócito. **D:** Detalhe do íntimo contato entre a célula da granulosa e o ovócito em folículo de gata, que mostra muitos “*coated pits*” (setas finas) no ooplasma. Notar o polirribossomo (seta grossa) livre no citoplasma. **E:** Associação entre gotas lipídicas, retículo endoplasmático liso (setas) e mitocôndria em ovócito de porca. O: ovócito, Nu: núcleo, GC: célula da granulosa, L: gota lipídica, Mt: mitocôndria, *: nucléolo.



4 TRANSIÇÃO DO FOLÍCULO PRIMÁRIO AO FOLÍCULO SECUNDÁRIO

Uma vez que o folículo primário inicia seu desenvolvimento este processo não sofre interrupção. Muitas alterações morfológicas ocorrerão no ovócito e nas células da granulosa nos estágios subsequentes da foliculogênese (66).

As organelas que estavam uniformemente distribuídas ao longo do citoplasma, nos estágios primordial e primário iniciais, migram para a periferia no ooplasma, já como folículos secundários, deixando um rastro, que é representado por uma região livre de organelas próximo ao núcleo (42). Em gatas, as organelas se apresentam aglomeradas (32). Em humanos, grupos de organelas denominados corpúsculos de Balbiani (67) são observados próximo ao núcleo. Em vacas (41;43;68), ovelhas (69), cabras (29;51;70), gatas (32), búfalas (27;46), bovídeos selvagens (39) e em humanos (67;71) os ovócitos de folículos secundários são predominantemente esféricos e apresentam citoplasma com vesículas e mitocôndrias arredondadas e alongadas. A mitocôndria é a organela mais abundante nos ovócitos de folículos secundários. Embora ainda seja observada a presença de mitocôndrias arredondadas (Figura 2A), a forma alongada se torna cada vez mais frequente ao longo do desenvolvimento folicular (Figura 2B). Em folículos secundários de búfalas e porcas isso é diferente, sendo as mitocôndrias arredondadas mais abundantes e as mitocôndrias alongadas bastante raras neste estágio de desenvolvimento (42;46).

Em ovócitos de algumas espécies, como gatas, podem ser observados dois tipos de mitocôndrias arredondadas (32), algumas com baixa densidade de eletrons e poucas cristas periféricas (Figura 2C) e outras bastante eletron-

densas e com muitas cristas periféricas. Em vacas e búfalas, é comum observar mitocôndrias que apresentam uma membrana que dá origem a um ou mais compartimentos (41;46), o que sugere divisão ao nível da organela (41). Em mitocôndrias de ovócitos de cabras, alguns cristais estão dispostos bastante próximos e paralelos à membrana externa da mitocôndria, que originam uma evidente área central de matriz interna com eletron-densidade moderada (51). Na matriz mitocondrial de porcas e vacas, grânulos eletron-densos são frequentemente observados (Figuras 2B, 2C e 2D) (39;41;43;72). Estes grânulos têm sido detectados em alguns tipos celulares, localizados especialmente em tecidos cujo transporte de água e íons é intenso, o que sugere que estes grânulos atuam na regulação do ambiente iônico interno da mitocôndria (53).

Silva et al. (42) revelaram que, em porcas, as mitocôndrias de formato arredondado, localizadas nos folículos secundários, são organizadas em forma de "colar de pérolas" (Figura 2E), o que também é observado em outras espécies (34). Mitocôndrias em formato de capuz ("*hooded*") (Figura 2F) e em formas pleomórficas (Figura 2G), podem ser visualizadas nos ovócitos de folículos secundários de ovelhas (73), bovinos domésticos (74) e selvagens (39;73-75). Além de mitocôndrias, outras organelas são regularmente observadas, como retículo endoplasmático e cisternas de Golgi, que se agregam e se tornam desenvolvidos. Figuras mielínicas e vesículas são comumente observadas no ooplasma (41), há também inúmeros polirribossomos livres (Figura 1D) e uma quantidade crescente de gotas lipídicas (54). Em suínos as gotas lipídicas são abundantes e sofrem alterações na aparência, passando de pequenas gotas escuras arredondadas, em

ovócitos de folículos primordiais e primários, para grandes estruturas de coloração mais clara em ovócitos de folículos secundários (42).

A mudança de aparência sugere lipólise citoplasmática (76), mas também pode ser devido a alterações na composição de ácidos graxos ao longo do desenvolvimento ovocitário (42). Esta variação pode ser espécie-específica, ou estar relacionada a fatores fisiológicos ou dietéticos dos animais (77;78). Estas gotas lipídicas também estão presentes em bovinos (79) e ovócitos ovinos (80), embora em menor quantidade.

Em vacas (43) e búfalas (46) o número de vesículas citoplasmáticas aumenta em ovócitos ativos e chega a ocupar a maior parte do citoplasma dos ovócitos. Em suínos, algumas estruturas classificadas inicialmente como sendo vesículas, eram, na realidade, gotas lipídicas, o que foi comprovado por método de coloração específica (42). Em folículos secundários de gatas as vesículas são escassas. Em humanos elas surgem especialmente no estágio antral (19).

Lucci et al. (29) sugeriram que algumas vesículas secretoras poderiam conter material para a síntese de zona pelúcida, que é constituída de glicoproteínas, detectadas no citoplasma de folículos (81). Em folículos secundários a zona pelúcida geralmente pode estar completamente formada ao redor do ovócito. Em algumas espécies esta estrutura pode ser observada bem desenvolvida no estágio de folículo primário (Figura 3A) e em espécies como cabras (51), búfalas (46), vacas selvagens (39), porcas (42) e cadelas (34) a zona pelúcida não se encontra visível em folículos primários (Figura 3B), e muitas vezes nem em folículos secundários. Neste caso, apenas fragmentos de

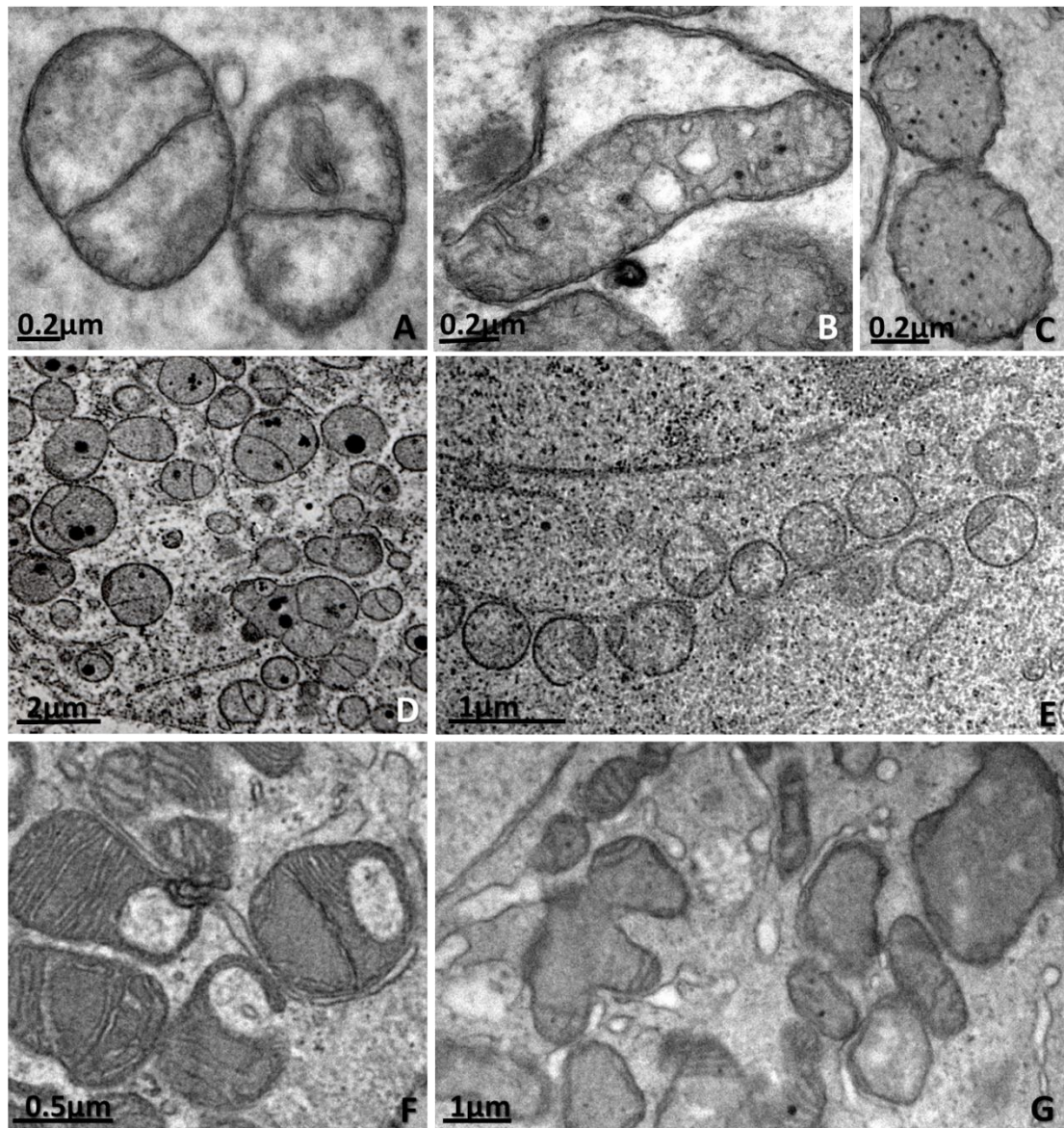


Figura 2. Tipos de mitocôndria observados em ovócitos de espécies mamíferas. **A:** Arredondada (porca). **B:** Alongada (porca). **C:** Arredondada com crista periférica (porca). **D:** Arredondadas com grânulos eletrôn-densos internos (vaca). **E:** Arredondadas em arranjo de “colar de pérolas” (cadela). **F:** Em format de capuz– “hooded” (vaca). **G:** Pleomórficas com cristas paralelas a membrana externa (cabra).

material de zona pelúcida pode ser observado (Figura 3C). A formação da zona pelúcida está relacionada com o aparecimento de microvilosidades que se apresentam eretas na membrana plasmática do ovócito. Além disso, podem ser observadas projeções de células da granulosa que se estendem da zona

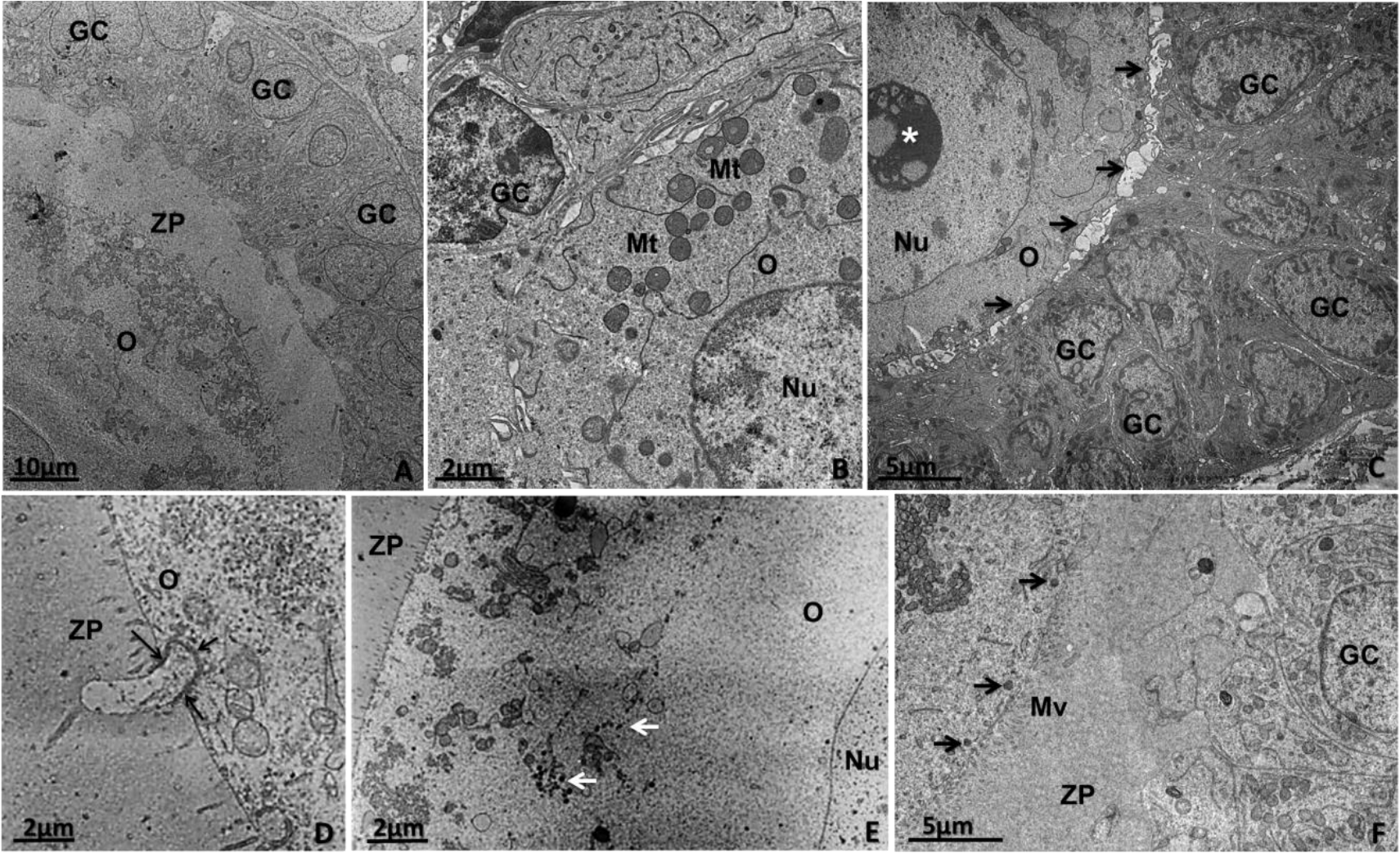
pelúcida em direção ao ovócito, onde junções comunicantes ou “*gap*” (Figura 3D) são encontradas entre as membranas celulares do ovócito e as membranas das células da granulosa (41;43).

As junções “*gap*” são responsáveis pela intercomunicação entre as células da granulosa e os ovócitos durante o desenvolvimento da célula germinativa feminina (82) e algumas evidências sugerem que interações entre células somáticas e ovócitos, mediadas pelas junções “*gap*”, são essenciais para o desenvolvimento e metabolismo ovocitário. Assim, nesta fase do desenvolvimento são encontrados também em pequena quantidade os “*coated pits*” (40).

Os grânulos corticais são vistos pela primeira vez em folículos secundários. Estas estruturas são pequenas organelas, como vesículas, contendo enzimas que sofrem exocitose após a fertilização. Nesta fase do desenvolvimento os grânulos da cortical estão alinhados próximo a membrana plasmática do ovócito e a liberação de seu conteúdo visa endurecer a zona pelúcida para evitar polispermia (para detalhes, ver 83). Em ovócitos de folículos secundários, os grânulos da cortical geralmente aparecem em grupos ou “*clusters*” (Figura 3E), seja distribuído por todo o ooplasma ou confinado à região cortical profunda perto do complexo de Golgi (40). Excepcionalmente, na gata doméstica esses grânulos já aparecem alinhados na região cortical do ovócito (Figura 3F) no estágio de folículo secundário (32). Esta característica, juntamente com a aglomeração de organelas, indica que, em gatas domésticas, o processo de maturação do ovócito ocorre mais cedo do que em outras espécies (32).

Em gatas selvagens, a região periférica do ooplasma apresenta grânulos da cortical em fase de maturação (45) e em vacas pequenos aglomerados de grânulos da cortical foram inicialmente observados em grandes ovócitos de folículos secundários (41). Em folículos secundários com estágio de desenvolvimento avançado tem início a formação da teca interna (37). Neste período, espaços adjacentes às células da granulosa começam a ser preenchidos com fluido folicular (51). O acúmulo progressivo de fluido provoca a distensão destas cavidades e a formação inicial do antro, caracterizando então o estágio folicular antral (63).

Figura 3. Desenvolvimento da zona pelúcida (ZP) e grânulos da cortical durante o crescimento folicular. **A:** Folículo primário de gata com a ZP completamente formada. **B:** Folículo primário de porca sem formação da ZP. **C:** Folículo secundário inicial de cadela com início de deposição de material da ZP ao redor do ovócito (setas). **D:** Detalhe de projeção da célula da granulosa através da ZP para dentro do ovócito, onde pode ser observado as junções “gap” (setas) em folículo secundário de porca. **E:** Folículo secundário desenvolvido de vaca com grânulos da cortical organizados em “clusters”. **F:** Folículo secundário de gata com grânulos da cortical (setas) alinhados próximo à membrana plasmática. Observe as microvilosidades da membrana plasmática do ovócito na ZP. O: ovócito, Nu: núcleo, GC: célula da granulosa, ZP: zona pelúcida, *: nucléolo, Mt: mitocôndria, Mv: Microvilosidade.



A transição de folículos pré-antrais para os estágios iniciais de folículo antral é uma fase crítica do desenvolvimento folicular em termos do destino do folículo, ou seja: crescimento ou atresia. Durante este período, a interação entre o ovócito e células somáticas (granulosa e da teca) é especialmente importante e muitos fatores de crescimento estão envolvidos (para uma revisão ver (84).

5 FORMAÇÃO DO ANTRO E MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

A formação do antro é mais tardia em folículos de porcas (com 400 μm de diâmetro) (85) do que em vacas (120-160 μm) (86) e ovelhas (220 μm - 300 μm) (87;88). Diferenças no momento da formação do antro podem ser importantes na trajetória da foliculogênese, uma vez que existe um aumento substancial da taxa de crescimento dos folículos após a formação do antro. O antro repleto de fluido separa as células do *cumulus*-ovócito, que envolvem o ovócito, das células da granulosa murais, que revestem a parede do folículo (para revisão, ver 89).

De modo geral, em folículos terciários, todos os ovócitos estão completamente rodeados pela zona pelúcida, que é atravessada por projeções das células da granulosa que formam reentrâncias na oolema (43). Neste estágio de desenvolvimento as organelas já atingiram uma distribuição mais uniforme ao longo do ooplasma, existindo um aumento na quantidade de mitocôndrias alongadas, presença de gotas lipídicas e vesículas (55). A grande quantidade de lipídeos em ovócitos de búfalas foi confirmada por meio de adição de TioI no meio de cultura de maturação *in vitro* (90). Em ovócitos

oriundos de folículos de búfalas (6mm de diâmetro) as organelas estão localizadas na região perinuclear, mitocôndrias na área periférica e gotas lipídicas na área medular (27). Os autores sugeriram que essa organização indica uma alta taxa metabólica destes ovócitos, que tende a aumentar com seu desenvolvimento e crescimento.

Várias alterações ultraestruturais podem ser observadas em organelas citoplasmáticas durante a maturação do ovócito. As mitocôndrias migram de uma posição periférica (Figura 4A), antes da ação do hormônio luteinizante (LH) para uma distribuição dispersa por todo o citoplasma (não mostrado) e formam agrupamentos periféricos nos estágios finais da maturação nuclear (Figura 4B) e uma nova dispersão após a extrusão do corpúsculo polar (91).

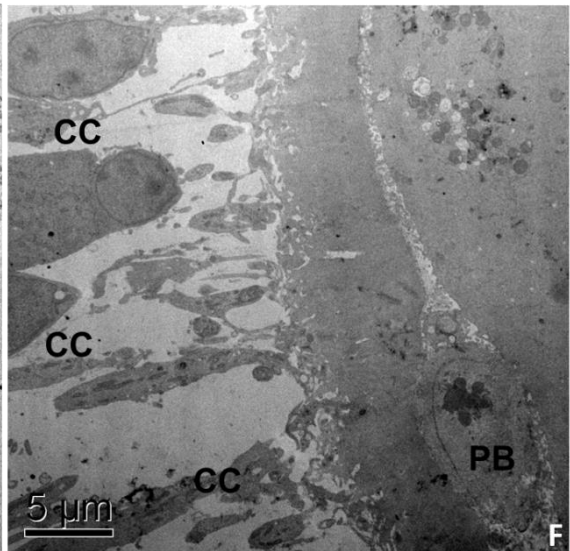
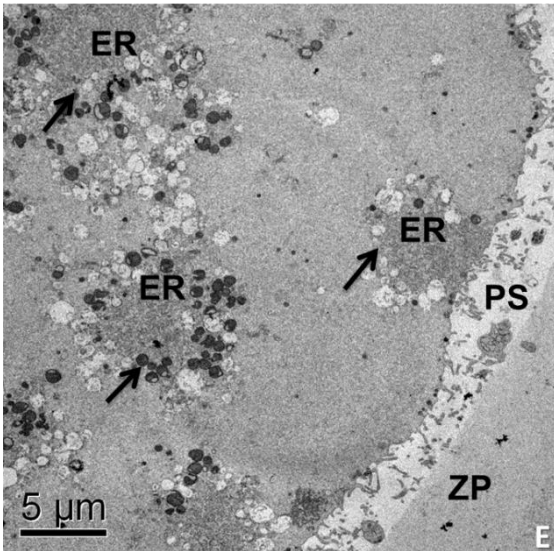
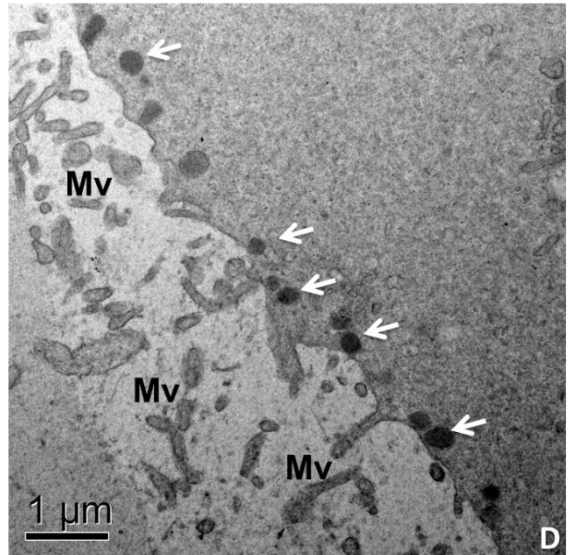
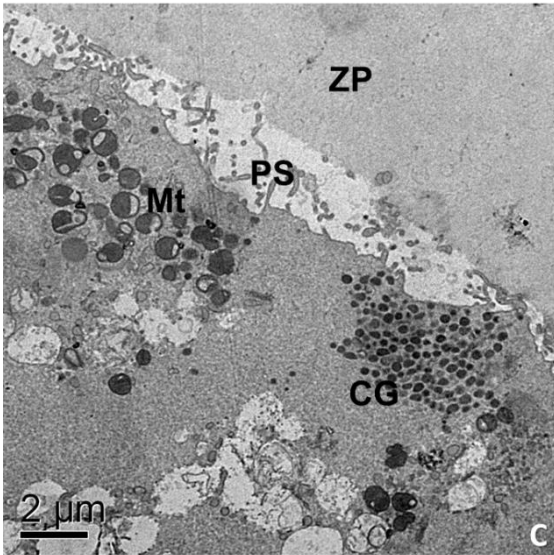
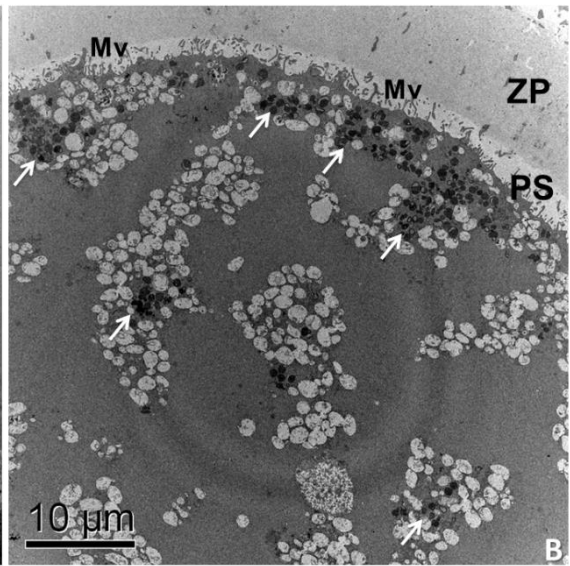
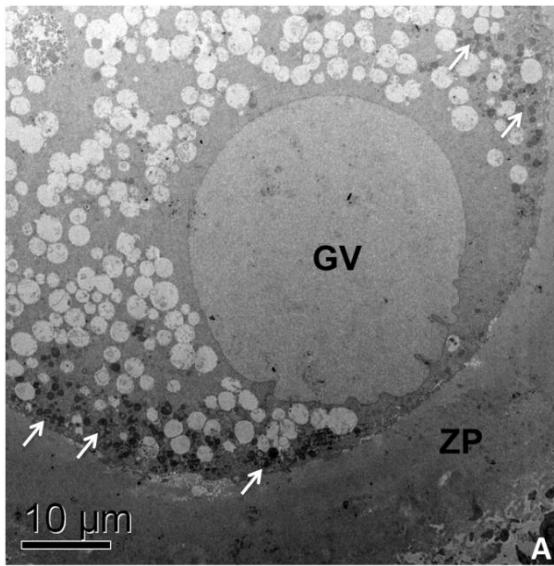
Nessa fase de desenvolvimento, as microvilosidades do ovócito se desprendem da zona pelúcida (Figura 4B). Ao chegar ao estágio de metáfase II as mitocôndrias e gotas lipídicas ocupam uma posição central na célula (55). Os grânulos da cortical que formaram aglomerados no córtex de ovócitos de folículos secundários (40) migram progressivamente para as áreas próximas à membrana plasmática em ovócitos de folículos antrais (Figura 4C) (92;93). Os grânulos da cortical são oriundos do complexo de Golgi e produzidos continuamente até o momento da ovulação (94). A migração dos grânulos da cortical para a periferia do ovócito é importante na maturação citoplasmática do ovócito (95). Ao final do período de maturação, quando os ovócitos atingem a metáfase II, os grânulos da cortical estão alinhados na superfície interna da membrana plasmática do ovócito (Figura 4D) (96;97).

Além disso, o citoplasma de ovócitos de folículos terciários é caracterizada pela presença de mitocôndrias com formato de capuz (“hooded”)

e também mitocôndrias pleomórficas, cisternas de Golgi bem desenvolvidas, principalmente na periferia da ooplasma (98). Associações entre retículo endoplasmático rugoso e liso, mitocôndrias e cisternas de Golgi se tornam comuns (Figura 4E) (99). A dinâmica das membranas das cisternas de Golgi durante a maturação e fertilização em mamíferos requer mais estudo. As membranas do retículo endoplasmático são fisiologicamente ativas e interagem com o citoesqueleto (100). A reorganização do retículo endoplasmático na maturação do ovócito é um processo complexo que envolve várias etapas e fases diferentes que dependem de microtúbulos e microfilamentos(101).

Finalmente, o ovócito maduro é ovulado (na maioria das espécies), normalmente na fase de metáfase II, tendo ocorrido a extrusão do primeiro corpúsculo polar (Figura 4F). Ressalta-se que todas as mudanças morfológicas são concomitantes às modificações bioquímicas e moleculares (para detalhes, ver 100,102), que conduzem os ovócitos para a maturação nuclear e citoplasmática e garantem a sua competência para a fertilização.

Figura 4. Eventos ultraestruturais que ocorrem durante a maturação em bovinos. **A:** Ovócito de folículo terciário com vesicular germinativa intacta (GV), mostrando mitocôndrias (setas) em posição periférica. Observar o grande número de vesículas espalhadas no citoplasma. **B:** Ovócito após 12 horas de maturação *in vitro* (MIV) mostrando mitocôndrias agrupadas principalmente na área cortical (setas). Microvilosidades desprendidas da ZP. Observar a organização geral de organelas em pequenos grupos. **C:** Ovócito após 12 horas de MIV. Grupos de grânulos da cortical estão localizados periféricamente no ooplasma, próximo à membrana plasmática. Observar o grupo de mitocôndrias pleomórficas e com capuz (*hooded*). **D:** Ovócito após 18 horas de MIV mostrando grânulos da cortical (setas) alinhados à membrana plasmática. **E:** Ovócito após 18 horas de MIV. Observar o arranjo peculiar das organelas, com retículo endoplasmático em associação íntima às mitocôndrias e vesículas (setas). **F:** Ovócito após 24 horas de MIV com a extrusão do primeiro corpúsculo polar (PB). Notar as células do *cumulus* expandidas. GV: vesícula germinativa, PS: espaço perivitelínico, ZP: zona pelúcida, Mv: microvilosidade, Mt: mitocôndria, CG: grânulo da cortical, ER: retículo endoplasmático, CC: células do *cumulus*, PB: corpúsculo polar.



6 CONCLUSÕES

Nas últimas décadas, a compreensão da fisiologia reprodutiva em mamíferos tem sofrido grandes avanços, especialmente no que diz respeito aos folículos pré-antrais. Muitos aspectos morfológicos e ultraestruturais de ovócitos foram identificados, o que permitiu uma melhor compreensão da sua fisiologia. Este conhecimento pode possibilitar melhorias nas biotecnologias reprodutivas, especificamente, no auxílio da compreensão de danos e pontos limitantes da manipulação *in vitro* de ovócitos em diferentes espécies.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KOERING, M. J. Cyclic changes in ovarian morphology during the menstrual cycle in macaca mulatta. *American Journal of Anatomy*, v. 126, p.73-101, 1969.
2. VANWEZEL, I. L.; RODGERS, R. J.; Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 1003-1011, 1996.
3. HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VANDENHURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. *Veterinary Quarterly*, v. 16, p. 78-80, 1994.
4. HSUEH, A. J. W.; ADASHI, E. Y.; JONES, P. B. C.; WELSH, T. H. Hormonal-regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa-cells. *Endocrine Reviews*, v. 5, p. 76-127, 1984.
5. RICHARDS, J. S. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*, v. 15, p. 725-751, 1994.
6. CHUN, S. Y.; HSUEH, A. J. W. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 39, p. 63-75, 1998.
7. ROY, S. K.; GREENWALD, G. S. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87, p. 103-114, 1989.
8. NAYUDU, P. L.; OSBORN, S. M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 95, p. 349-362, 1992.
9. CAIN, L.; CHATTERJEE, S.; COLLINS, T. J. In-vitro folliculogenesis of rat preantral follicles. *Endocrinology*, v. 136, p. 3369-3377, 1995.
10. PICTON, H. M. Activation of follicle development: The primordial follicle. *Theriogenology*, v. 55, p.1193-1210, 2001.
11. WASSARMAN, P. M.; JOSEFOWICZ, W. J.; Oocyte development in mouse - ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *Journal of Morphology*, v. 156, p. 209-235, 1978.
12. AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part ii: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals*,v. 45, p. 180-187, 2010.
13. RÜSSE, I. *Gametogenese & harn- und geschlechtsorgane*. Verlag Paul Parey: Berlin, 1991.
14. PETERS, H. The development and maturation of the ovary. *Annales De Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, v.16, p. 271-278, 1976,.
15. GOSDEN, R. G.; BOWNES, M. *Cellular and molecular aspects of oocyte development* Cambridge: London, 1995, 456p.
16. GOSDON, B. *Oogonia and oocytes in mammals*. New York: Plenum Press. 1978.
17. JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J. K.; TILLY, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, v. 430, p. 1062-1062, 2004.
18. NOTARIANNI, E. Reinterpretation of evidence advanced for neo-oogenesis in mammals, in terms of a finite oocyte reserve. *Journal of Ovarian Research*, v. 4, p.1, 2011.
19. SATHANANTHAN, A. H.; SELVARAJ, K.; GIRIJASHANKAR, M.L.; GANESH, V.; SELVARAJ, P.; TROUNSON, A. O. From oogonia to mature oocytes: Inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy Research and Technique*, v. 69, p. 396-407, 2006.
20. FORABOSCO, A.; SFORZA, C. Establishment of ovarian reserve: a quantitative morphometric study of the developing human ovary. *Fertility and Sterility*, v. 88, n. 3, 2007.

21. PETERS, H. The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinologica*, v. 62, p. 98-116, 1969.
22. MERCHANT-LARIOS, H.; CHIMAL-MONROY, J. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Progress in clinical and biological research*, v. 296, p. 55-63, 1989.
23. VASKIVUO, T. *Regulation of apoptosis in the female reproductive system*. 2011. 83p. Dissertation- Faculty of Medicine, University of Oulo, Finland.
24. ERICKSON, B. H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 11, p. 97-105, 1966.
25. LUCCI, C. M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J. R.; BAO, S. N. Zebu (*bos indicus*) ovarian preantral follicles: Morphological characterization and development of an efficient isolation method. *Theriogenology*, v. 57, p. 1467-1483, 2002.
26. SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I.; STURION, L.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *bos taurus indicus* and *bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, v. 76, p. 1051-1057, 2011.
27. MONDADORI, R. G.; SANTIN, T. R.; FIDELIS, A. A.; PORFIRIO, E. P.; BAO, S. N. Buffalo (*bubalus bubalis*) pre-antral follicle population and ultrastructural characterization of antral follicle oocyte. *Reproduction in domestic animals*, v. 45, p. 33-37, 2010.
28. LAND, R. B. Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and finnish landrace cross blackface and welsh sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 21, p. 517-521, 1970.
29. LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; BÃO, S. N.; SILVA, J. R. V.; GONÇALVES, P. B. D. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Animal Reproduction Science*, v. 56, p. 223-236, 1999.
30. GOUGEON, A.; ECOCHARD, R.; THALABARD, J. C. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: Increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biology of Reproduction*, v. 50, p. 653-663, 1994.
31. DOMINGUES, S. F. S.; DINIZ, L. V.; FURTADO, S. H. C.; OHASHI, O. M.; RONDINA, D.; SILVA, L. D. M. Histological study of capuchin monkey (*cebus apella*) ovarian follicles. *Acta Amazonica*, v. 34, p. 495-501, 2004.
32. CARRIJO JUNIOR, O. A.; MARINHO, A. P.; CAMPOS, A. A.; AMORIM, C. A.; BAO, S. N.; LUCCI, C. M. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. *Cells, tissues, organs*, v. 191, p. 152-160, 2010.
33. ERICKSON, B. H. Radioresponse of the pre-puberal porcine ovary. *International Journal of Radiation Biology & Related Studies in Physics, Chemistry & Medicine*, v. 13, n. 1, p. 57-67, 1967.
34. JIVAGO, J. L. P. R. *Estudo da população e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas*. 2012. 70p. Dissertation (Animal Biology)- Post-Graduation Program in Animal Biology, University of Brasilia, Brasília.
35. RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F.; Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction*, v. 139, p. 309-318, 2010.
36. ROSS, M.; ROMELL, L. J.; KAYE, G. I. *Histology: A text and atlas*. 3.ed. USA: LWW. 1995. 974p.
37. BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 109, p. 165-171, 1997.
38. YANG, Y. J.; ZHANG, Y. J.; LI, Y. Ultrastructure of human oocytes of different maturity stages and the alteration during in vitro maturation. *Fertility and Sterility*, v. 92, p. 391-396, 2009.
39. YU, S. J.; YONG, Y. H.; CUI, Y. Oocyte morphology from primordial to early tertiary follicles of yak. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45, p. 779-785, 2010.

40. FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 46, p. 208-215, 1997.
41. KACINSKIS, M. A.; LUCCI, C. M.; LUQUE, M. C.; BAO, S. N. Morphometric and ultrastructural characterization of bos indicus preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 87, p. 45-57, 2005.
42. SILVA, R. C.; BAO, S. N.; JIVAGO, J. L.; LUCCI, C. M. Ultrastructural characterization of porcine oocytes and adjacent follicular cells during follicle development: Lipid component evolution. *Theriogenology*, v. 76, p. 1647-1657, 2011.
43. FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*, v. 195, p. 327-336, 1997.
44. GREENWALD, G. S.; MOOR, R. M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 87, p. 561-571, 1989.
45. JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats—viability and ultrastructural investigations. *Animal Reproduction Science*, v. 44, p. 183-193, 1996.
46. MONDADORI, R. G.; LUQUE, M. C.; SANTIN, T. R.; BAO, S. N. Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 97, p. 323-333, 2007.
47. BROWN, D. A. Lipid droplets: Proteins floating on a pool of fat. *Current Biology*, v. 11, p. R446-R449, 2001.
48. DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 77, p. 21, 2007.
49. RIZZUTO, R.; BERNARDI, P.; POZZAN, T. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *The Journal of Physiology*, v. 529, p. 37-47, 2000.
50. BERNHARD, W.; ROUILLER, C. Close topographical relationship between mitochondria and ergastoplasm of liver cells in a definite phase of cellular activity. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, v. 2, p. 73-78, 1956.
51. LUCCI, C. M.; SILVA, R. V.; CARVALHO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; BÃO, S. N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 41, p. 61-69, 2001.
52. READER, K. L. *A quantitative ultrastructural study of oocytes during the early stages of ovarian follicular development in booroola and wild-type sheep*. 2007. 93p. Thesis (Master of Science in Cell and Molecular Biology)- Victoria University of Wellington, Wellington.
53. FAWCETT, D. W. *An atlas of fine structure: the cell, Its organelles and inclusions*. USA: W. B Saunders Co. 1966. 448p.
54. FAIR, T. *Oocyte growth in cattle: Ultrastructure, transcription and developmental competence*. Dublin: University College Dublin. 1995. 140p.
55. HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v. 47, p. 23-32, 1997.
56. HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, v. 124, p. 43-101, 1991.
57. HAGE, A. J.; GROEN-KLEVANT, A. C.; WELSCHEN, R. Follicle growth in the immature rat ovary. *Acta Endocrinologica*, v. 88, p. 375-382, 1978.
58. BODENSTEINER, K. J.; CLAY, C. M.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 381-386, 1999.
59. ODOR, D. L. Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, v. 7, p. 567-574, 1960.
60. OAKBERG, E. F. Follicular growth and atresia in the mouse. *In Vitro*, v. 15, p. 41-49, 1979.

61. ADAMS, E. C.; HERTIG, A. T. Studies on guinea pig oocytes. I. Electron microscopic observations on the development of cytoplasmic organelles in oocytes of primordial and primary follicles. *The Journal of Cell Biology*, v. 21, p. 397-427, 1964.
62. NICOSIA, S. V.; EVANGELISTA, I.; BATTÀ, S. K. Rabbit ovarian follicles. I. Isolation technique and characterization at different stages of development. *Biology of Reproduction*, v. 13, p. 423-447, 1975.
63. ZAMBONI, L. Fine morphology of follicle wall and follicle cell oocyte association. *Biology of Reproduction*, v. 10, p. 125-149, 1974.
64. HIMELSTEIN-BRAW, R.; BYSKOV, A. G.; PETERS, H. FABER, M. Follicular atresia in the infant human ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 46, p. 55-59, 1976.
65. NEWTON, H.; AUBARD, Y.; RUTHERFORD, A.; SHARMA, V.; GOSDEN, R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Human Reproduction*, v. 11, p. 1487-1491, 1996.
66. MATZUK, M. M.; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J. J. Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science*, v. 296, p. 2178-2180, 2002.
67. DE BRUIN, J. P.; DORLAND, M.; SPEK, E. R.; POSTHUMA, G.; VAN HAAFTEN, M.; LOOMAN, C. W. N.; VELDE, E. R. Ultrastructure of the resting ovarian follicle pool in healthy young women. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 1151-1160, 2002.
68. HYTTEL, P.; XU, K. P.; SMITH, S.; GREVE, T. Ultrastructure of invitro oocyte maturation in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 78, p. 615-625, 1986.
69. HAY, M.; CRAN, D. G.; MOOR, R. M. Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. *Cell and Tissue Research*, v. 169, p. 515-529, 1976.
70. SHARMA, R.; SAWHNEY, A. K. Fine morphology of membrane granulose in caprine ovary. *The Indian Journal of Animal Sciences*, v. 69, p. 109-113, 1999.
71. WESTERGAARD, C. G.; BYSKOV, A. G.; ANDERSEN, C. Y. Morphometric characteristics of the primordial to primary follicle transition in the human ovary in relation to age. *Human Reproduction*, v. 22, p. 2225-2231, 2007.
72. ASSEY RJ, HYTTEL P, ROCHE JF, BOLAND MP: Infrequent structures in cattle oocytes. *Anat Embryol* 1994, 190:263-271.
73. CRAN DG, MOOR RM, HAY MF: Fine-structure of the sheep oocyte during antral follicle development. *J Reprod Fertil* 1980, 59:125-&.
74. FLEMING WN, SAACKE RG: Fine structure of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. *J Reprod Fertil* 1972, 29:203-213.
75. RUSSE I: Symposium on scanning electron microscopy of fertility and infertility, eighth world congress of fertility and sterility, buenos aires, argentina, november 1974. Unfertilized sheep eggs. *The Journal of reproductive medicine* 1975, 14:200-204.
76. ISACHENKO V, ISACHENKO E, MICHELMANN HW, ALABART JL, VAZQUEZ I, BEZUGLY N, NAWROTH F: Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine gv-oocytes. *Anatomia, histologia, embryologia* 2001, 30:333-338.
77. ADAMIAK SJ, MACKIE K, WATT RG, WEBB R, SINCLAIR KD: Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biology of reproduction* 2005, 73:918-926.
78. LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; BOLS, P. E. J.; DE KRUIF, A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v. 80, p. 201-211, 2004.
79. BASSO, A. C.; ESPER, C. R. Isolation and ultrastructural characterization of preantral follicles in the nelore breed cows (*bos taurus indicus*) *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, n. 6, 2002.
80. ANDRADE, E. R.; MADDOX-HYTTEL, P.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; SILVA, J. R.; ALFIERI, A. A.; SENEDA, M. M.; FIGUEIREDO, J. R.; TONIOLLI, R. Ultrastructure of sheep primordial follicles cultured in the presence of indol acetic acid, EGF, and FSH. *Veterinary Medicine International*, 2011.

81. WOLGEMUTH, D. J.; CELENZA, J.; BUNDMAN, D. S.; DUNBAR, B. S. Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Developmental Biology*, v. 106, p. 1-14, 1984.
82. GRAZUL-BILSKA, A. T.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Gap junctions in the ovaries. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 947-957, 1997.
83. LIU, M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive biology and endocrinology Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 9, p. 149, 2011.
84. ORISAKA, M.; TAJIMA, K.; TSANG, B. K.; KOTSUJI, F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research*, v. 2, 2009.
85. MORBECK, D. E.; ESBENSHADE, K. L.; FLOWERS, W. L.; BRITT, J. H. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of Reproduction*, v. 47, p. 485-491, 1992.
86. LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 81, p. 301-307, 1987.
87. CAHILL, L. P.; MAULEON, P. Influences of season, cycle and breed on follicular-growth rates in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 58, p. 321-328, 1980.
88. TURNBULL, K. E.; BRADEN, A. W.; MATTNER, P. E. The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Australian Journal of Biological Sciences*, v. 30, p. 229-241, 1977.
89. MOTTA, P. M.; NOTTOLA, S. A.; FAMILIARI, G.; MAKABE, S.; STALLONE, T.; MACCHIARELLI, G. Morphodynamics of the follicular-luteal complex during early ovarian development and reproductive life. *International Review of Cytology*, v. 223, p. 177-288, 2003.
90. GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; MARCHANDISE, J.; DI PALO, R.; GEORGE, F.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology*, v. 65, p. 275-287, 2006.
91. KRUIP, T. A. M.; CRAN, D. G.; VAN BENEDEN, T. H.; DIELEMAN, S. J. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Research*, v. 8, p. 29-47, 1983.
92. BACA, M.; ZAMBONI, L. The fine structure of human follicular oocytes. *Journal of Ultrastructure Research*, v. 19, p. 354-381, 1967.
93. SATHANANTHAN, A. H.; TROUNSON, A. O. The human pronuclear ovum: Fine structure of monospermic and polyspermic fertilization in vitro. *Gamete Research*, v. 12, p. 385-398, 1985.
94. GULYAS, B. J. Cortical granules of mammalian eggs. *International Review of Cytology*, v. 63, p. 357-392, 1980.
95. DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; CIBELLI, J. B.; LONG, C. R.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 45, p. 521-534, 1996.
96. CONNER, S.; LEAF, D.; WESSEL, G. Members of the snare hypothesis are associated with cortical granule exocytosis in the sea urchin egg. *Molecular Reproduction and Development*, v. 48, p. 106-118, 1997.
97. THIBAUT, C.; SZOLLOSI, D.; GERARD, M. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction, Nutrition, Development*, v. 27, p. 865-896, 1987.
98. ASSEY, R. J.; HYTTEL, P.; KANUYA, N. Oocyte structure in dominant and subordinate follicles in zebu cattle (*bos-indicus*). *Anatomy Embryology*, v. 190, p. 461-468, 1994.
99. DE BRUIN, J. P.; DORLAND, M.; SPEK, E. R.; POSTHUMA, G.; VAN HAAFTEN, M.; LOOMAN, C. W. N.; VELDE, E. R. T. Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 419-424, 2004.
100. FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v. 71, p. 836-848, 2009.

101. MEHLMANN, L. M.; TERASAKI, M.; JAFFE, L. A.; KLINE, D. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*, v. 170, p. 607-615, 1995.
102. MAO, L.; LOU, H.; LOU, Y.; WANG, N.; JIN, F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 28, p. 284-299, 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No estudo das técnicas de imagem para a visualização dos ovários e suas estruturas, o ultrassom é a técnica não invasiva mais utilizada, em função do custo, portabilidade e resolução suficiente para diagnosticar diversas anormalidades ovarianas. A limitação desta técnica para visualizar o interior do ovário com alta definição, mesmo após inovações 3D e associação com doppler, impulsiona o uso da RM e TC no estudo do ovário e no diagnóstico fisiopatológico. É pouco provável que alguma técnica não invasiva possa vir a ser utilizada na identificação de folículos pré-antrais. A complementariedade entre as técnicas de imagem vai sempre existir, em função da variação entre a disponibilidade dos equipamentos, praticidade, velocidade para obtenção de diagnósticos, qualidade de resolução, custo e preferências individuais.

A identificação de aspectos morfológicos e ultraestruturais de folículos e ovócitos, em diferentes fases do desenvolvimento folicular, representa um avanço na caracterização e concepção da anatomia e fisiologia ovariana em diferentes espécies. Avanços na eficiência reprodutiva dependem da modernização e da apropriação plena dos equipamentos e técnicas de imagem, que têm subsidiado progressos exponenciais no estudo do ovário humano e animal, mas ainda existem desafios e gargalos.

Os resultados dessa pesquisa abrem perspectivas para estudos não invasivos com o uso da técnica de tomografia computadorizada no acompanhamento de procedimentos de reprodução assistida, visto que os resultados podem vir a ser extrapolados para o uso da técnica *in vivo* e

avaliação dos ovários *in locu* e para o diagnóstico patológico em ovários de animais domésticos.

Deste modo, o conhecimento gerado nesta tese é uma contribuição à pesquisa básica sobre o ovário em diferentes espécies domésticas, que pode subsidiar melhorias nas biotécnicas reprodutivas, como a detecção e compreensão de danos causados pela manipulação dos ovários em diferentes espécies. As técnicas de TC e MET são promissoras para a pesquisa científica e para a rotina clínica ligada à reprodução humana e animal com destaque ao ovário.