



Desenvolvimento embrionário: quando avaliar o fenótipo e sua relação com o genótipo

Embryonic development: when to evaluate its phenotype and its relationship with genotype

Julia Linck Moroni¹, Michael Dyck¹

Faculty of Agricultural, Life & Environmental Sciences, University of Alberta, T6G 2R3, Edmonton, AB, Canada

Resumo

Durante as últimas décadas, a suinocultura vivencia um processo de intensa seleção genética. Dentre as características reprodutivas, a taxa ovulatória sofreu avanços significativos e, como consequência, o aumento do tamanho da leitegada em fêmeas suínas contemporâneas é evidente. No entanto, essa pressão de seleção gerou também características indiretas indesejáveis, como o baixo peso ao nascimento e grande variabilidade de peso ao nascimento dentro de uma mesma leitegada. Desta forma, durante os últimos anos, inúmeros estudos buscaram entender os principais aspectos relacionados ao desenvolvimento embrionário e pré-natal em suínos. A capacidade de elucidar aspectos relacionados à regulação do desenvolvimento embrionário e placentário, aos genes centrais e marcadores moleculares que estão relacionados ao adequado desenvolvimento e qualidade embrionária contribuem para a compreensão da reprodução básica e facilitam o entendimento das relações materno-embrionárias no período gestacional.

Palavras-chave: Desenvolvimento embrionário, reprodução, embrião, fêmea suína

Abstract

During the last few decades, the swine industry has undergone an intense process of genetic selection. Among the reproductive characteristics, the ovulation rate has undertaken significant advances, and, consequently, the increase in litter size is evident in contemporaneous sows. However, the selection pressure also resulted in undesired indirect characteristics, as the low birth weight and birth weight variability within the litter. Therefore, during the last few years, many studies have shed light on the aspects related to embryonic and prenatal development in pigs. The ability to understand how embryonic development is regulated, the central genes and molecular markers that are related to appropriate development, and embryonic quality contribute to the understanding of basic reproduction and facilitates the understanding of embryo-maternal relationships.

Keywords: Embryonic development, reproduction, embryo, sow

Introdução

Durante as últimas décadas, a suinocultura vivencia um processo de intensa seleção genética. Como resultado, os principais sistemas de criação genética de suínos experimentam avanços significativos em características que afetam diretamente a eficiência da produção de suínos. Neste cenário, características reprodutivas receberam importante foco. Um exemplo específico é o aumento no número de nascidos totais nas últimas décadas (Boulot et al., 2008). O tamanho de leitegada tem sido alvo de programas de seleção por gerações por meio de aumento na taxa de ovulação (Schneider et al., 2014).

No entanto, a pressão de seleção sobre o número de nascidos totais resultou em um aumento desproporcional na taxa de ovulação, que não foi acompanhada por um aumento da capacidade uterina. Desta forma, o desenvolvimento intrauterino foi prejudicado indiretamente. Como consequência, baixo peso ao nascimento e alta variabilidade de peso ao nascer em uma mesma leitegada se tornaram eventos comuns e, inevitavelmente, altas taxas de mortalidade pós-natais podem ser observadas (Quiniou et al., 2002). Esse cenário fez com que o desenvolvimento pré-natal em suínos fosse estudado em detalhe durante as últimas décadas.

¹Correspondência: linckmor@gmail.com

Recebido: 23 de outubro de 2021

Aceito: 09 de dezembro de 2021



Período gestacional em fêmeas suínas

Em leitões ou fêmeas múltiparas inseminadas, a fertilização ocorre poucas horas após a ovulação, próximo à junção da ampola com o istmo do oviduto (Bazer e First, 1983). Aproximadamente 48 horas após a fertilização, o embrião suíno passa do estágio de 2 células para 4 células. Até este momento, os embriões dependem de sinais genômicos maternos. Todavia, a partir do momento em que atingem o estágio de 4 células, a ativação do genoma embrionário se inicia (Dyck e Ruvinsky, 2011).

Os embriões nos estágios de 4 a 8 células entram no corno uterino, cerca de 60-72 horas após o início do estro (Bazer e Johnson, 2014) ou, aproximadamente, 46 horas após a ovulação (Hunter, 1974). Por volta do final de 3 dias de gestação, os embriões se desenvolvem até o estágio de 16 ou mais células, chamado de mórula (Hunter, 1974). A partir do estágio de 30 células, uma cavidade chamada blastocisto se forma. O blastocisto começa a aumentar o número de células e a se diferenciar em dois tipos celulares distintos: massa celular interna, que resulta na estrutura embrionária, e trofoblasto, necessário para o processo de implantação. Durante este período, o embrião mede cerca de 0,5 a 1 mm em diâmetro e se expande de 2 para 6 mm no décimo dia de gestação (Bazer e Johnson, 2014).

O blastocisto em desenvolvimento eclode da zona pelúcida no dia 7 de gestação e é exposto pela primeira vez ao epitélio uterino. O contato direto com o ambiente uterino e suas secreções influenciam o desenvolvimento embrionário (Hunter, 1977). Durante a fase inicial de gestação (entre os dias 0 e 5), a progesterona estimula a atividade secretória do útero; no dia 10 de gestação, os níveis de progesterona diminuem, mas aumentam novamente no dia 12 de gestação (Geisert et al., 1994). Simultaneamente, fatores de crescimento são liberados pelo epitélio uterino. Este período marca o início do espaçamento, sinalização da gestação, alongamento embrionário e posterior ligação do trofotoderma ao epitélio uterino (Bazer e Johnson, 2014).

O processo de alongamento ocorre durante os dias 11 e 12 de gestação e é caracterizado pela transição do formato esférico e ovoide para os estágios tubular e finalmente, filamentosos. Esse processo é baseado na hipertrofia do trofotoderma e endoderma e ocorre apenas quando o embrião atinge pelo menos 10 mm em tamanho (Bazer e Johnson, 2014). Esse período é marcado por um complexo padrão de expressão gênica (Ross et al., 2003). De acordo com Bazer e Johnson (2014), a velocidade de desenvolvimento embrionário aumenta drasticamente em algumas horas. Por exemplo, durante os estágios iniciais, o alongamento ocorre em uma velocidade de 0,25 mm/hora e aumenta para 150 a 200 mm/hora durante o período de formação filamentosos, o qual culmina com um embrião de 80 a 100 cm, aos 16 dias de gestação. Essa rápida transição morfológica permite encontrar, no mesmo útero, conceitos em diferentes estágios de desenvolvimento (esférico, tubular e filamentosos), durante este período (Bazer e Johnson, 2014). De acordo com Ross et al (2003), 142 genes são diferencialmente expressados durante os estágios mencionados acima.

O grau de alongamento que o embrião atinge permite a máxima área de superfície de contato entre o trofotoderma e o epitélio uterino (Bazer, 2013) e determina o espaço uterino que será ocupado por cada embrião durante a implantação. Embriões que experimentam um desenvolvimento retardado ou tardio se fixam em uma área limitada (Geisert et al., 1982), o que, finalmente, resultará em uma menor área placentária (Stroband e Van der Lende, 1990) e maior chance de mortalidade embrionária (Anderson, 2000). Juntamente com o alongamento, os embriões começam a se diferenciar em camadas germinativas em um processo chamado gastrulação. Por meio deste processo, endoderma, mesoderma e ectoderma são formados e darão origem a diferentes tipos de tecido ao longo do processo de desenvolvimento (Fléchon et al., 2004).

Para sinalizar sua presença, os conceitos suínos começam a secretar estrogênio no estágio esférico (10 mm), entre os dias 11 e 12 de gestação (Geisert et al., 1982). Então, à medida que os embriões se desenvolvem de esféricos para filamentosos, a produção de estrogênio aumenta consideravelmente (Pope, 1988). Concomitantemente, os embriões em estágio de pré-implantação migram e se distribuem em ambos os cornos uterinos, permitindo que o estrogênio seja distribuído por toda extensão dos cornos uterinos (Pope et al., 1982). Esse processo, conhecido como espaçamento, parece ser aleatório e o espaçamento uniforme de embriões ao longo dos cornos uterinos é facilitado pelas contrações miométriais. No dia 12 de gestação, o espaçamento de embriões está completo, independentemente do número de embriões presentes (Dziuk, 1985).

É sabido que o estrogênio liberado pelos embriões durante o período de pré-implantação previne que a prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), produzida pelo epitélio uterino, seja direcionada ao sistema venoso uterino (Bazer e Thatcher, 1977). Através desse mecanismo, o estrogênio inibe o movimento de PGF_{2α} em direção aos ovários e, conseqüentemente, inibe a regressão dos corpos lúteos, permitindo o



estabelecimento e manutenção da prenhez decorrente da produção de progesterona (Bazer et al., 1989). Uma segunda onda de produção de estrogênio pelos conceptos ocorre durante os dias 15 e 30 de gestação, também considerada importante para a manutenção dos corpos lúteos (Geisert et al., 1990; Anderson, 2000). As mudanças no ambiente uterino em resposta à produção de estrogênio por parte dos conceptos, durante a primeira onda, é importante para manutenção e alongamento dos blastocistos. No entanto, esse cenário também torna embriões menos desenvolvidos mais propensos à mortalidade em um processo decorrente da denominada assincronia embrio-uterina (Pope, 1988). Isso ocorre devido ao fato de que embriões mais desenvolvidos influenciam o ambiente uterino de uma forma prejudicial para os embriões menos desenvolvidos (Pope et al., 1990).

Implantação e placentação

A função placentária em suínos é fortemente dependente do desenvolvimento vascular, área de trocas disponíveis para cada embrião, número de conceptos, e profundidade do estroma uterino (Knight et al., 1977). Neste contexto, a fase inicial de expansão trofoblástica é responsável por estabelecer e limitar o perímetro individual para o desenvolvimento placentário (Geisert et al., 1997) e, em função disso, uma extensa angiogênese ocorre na interface materno-fetal, a qual permite adequada transferência de nutrientes entre a mãe e os conceptos (Stenhouse et al., 2019). O processo de placentação já começa com a implantação (dia 13 de desenvolvimento), a qual requer a adesão e migração de células especializadas para que a fixação do trofotoderma embrionário ao endométrio materno ocorra (Bazer & Johnson, 2014). A completa fixação ocorre no dia de 18 de desenvolvimento (Friess et al., 1980), seguida de rápida expansão do trofotoderma e alantoide entre os dias 18 e 30 de gestação (Bazer & Johnson, 2014). A partir deste ponto, sangue materno e fetal estão em aposição, apesar de separados por seis camadas de células, as quais garantem a classificação da placenta suína como epiteliocorial (Bazer & Johnson, 2014). É ao redor dos 70 dias de gestação que o peso placentário e a área de superfície placentária estão completas (Knight et al., 1977).

A regulação apropriada de angiogênese uterina durante este período é fundamental para o estabelecimento e manutenção da gestação em suínos (Stenhouse et al., 2019). Para que a comunicação materna e fetal seja aumentada, invaginações e pregas são formados ao redor do dia 27 de gestação (Wright et al., 2016), aumentando a área de contato para a difusão de nutrientes (Enders & Blankenship, 1999). Apesar de não ser invasiva, a interdigitação do trofotoderma em direção ao endométrio é progressiva durante o período gestacional e tende a aumentar até que a placenta se encontre totalmente ocupada, sendo referida então, como placentação difusa (Bazer e Johnson, 2014).

A estrutura placentária é dividida em areolar, onde o trofotoderma não se funde com o epitélio luminal e área interareolar, onde o tecido endometrial materno se adere ao epitélio fetal (Vallet et al., 2014). A placenta de cada conceito possui aproximadamente 2500 aréolas, cujos lumes são preenchidos por secreções das glândulas uterinas, coletivamente conhecidas como histiotrofo, cuja composição inclui proteínas, íons, citocinas, enzimas, diversos fatores de crescimento, aminoácidos, proteases, glicose, entre outras substâncias (Bazer e Johnson, 2014).

Formação de membranas e vesículas

As camadas germinativas primárias da estrutura embrionária dão origem a quatro membranas conhecidas como saco vitelino vestigial, alantoide, âmnio e cório (Dyck e Ruvinsky, 2011). No início do desenvolvimento embrionário, o saco vitelino provê suporte nutritivo para os embriões e se funde com o cório em áreas altamente vascularizadas, permitindo uma máxima absorção de nutrientes (Hill, 2017). O âmnio ou saco amniótico é uma vesícula protetiva que envolve o embrião. Sua função é garantir um desenvolvimento simétrico do embrião, além de não permitir que haja uma adesão entre o embrião e as membranas externas. Sua formação é completa no dia 18 de gestação e à medida que se desenvolve, o saco alantoide forma uma invaginação que se expande rapidamente entre os dias 18 e 30 de gestação (Friess et al., 1980). Por fim, o cório se origina da cápsula trofoblástica do blastocisto. Conhecida como a membrana externa, ela rodeia o embrião e outras membranas fetais e é responsável por interagir com o trato materno (Dyck e Ruvinsky, 2011). A rápida expansão e acúmulo de fluido alantoico, entreos dias 18 a 30 de gestação, seguida da completa fusão do cório e alantoide, entre os dias 30 e 60 da gestação, origina a placentação corioalantoide (Steven, 1975). No dia 18, há um acúmulo de aproximadamente 1 ml de fluido no saco alantoico, enquanto ao redor do dia 30 esse acúmulo é de 200 a 250 ml (Goldstein et al., 1980). Após este período, o volume varia, diminuindo ao redor dos 45 dias, aumentando novamente



no dia 58 e diminuindo no dia 112 de gestação (Knight et al., 1977; Goldstein et al., 1980). O alantóide também suporta a estrutura vascular da placenta (Bazer e Johnson, 2014), sendo que, no dia 30 de gestação, o cório e os vasos alantóicos estão bem fundidos, formando a membrana corioalantóide.

Mortalidade embrionária

Estima-se que a mortalidade pré-natal em linhagens genéticas comerciais varia de 30 a 50% (Pope et al., 1972; Geisert e Schmitt, 2002). A proporção mais significativa ocorre durante a fase embrionária, isto é, até o dia 35 de gestação. A primeira onda representa de 20 a 30% dos embriões perdidos até o dia 21 de gestação e, então, a segunda onda com 10 a 15% dos embriões perdidos ocorre até o final do período embrionário (Ford et al., 2002). Nesse cenário, a mortalidade embrionária precoce ocorre antes do período de implantação e contribui para a maior taxa de mortalidade durante o período embrionário (Foxcroft et al., 2007). O estágio pré-implantação é seguido do período de alongamento, espaçamento e implantação, o que significa que drásticas mudanças morfológicas e endócrinas acontecem. Estudos reportam que a mortalidade embrionária nesse período não se deve à falta de espaço uterino, mas à assincronia na comunicação materno-embrionária e à heterogeneidade no desenvolvimento embrionário inicial (Pope et al., 1990; Langendijk et al., 2016). Como já discutido anteriormente, a heterogeneidade no desenvolvimento embrionário resulta em um ambiente não favorável para embriões menos desenvolvidos, quando o estrogênio começa a ser produzido por embriões mais desenvolvidos para sinalizar o reconhecimento materno da prenhez (Pope et al., 1990). A heterogeneidade embrionária também pode ser associada com a maior diversidade nas características foliculares e de oócitos (Pope et al., 1990), que, por sua vez, pode ser vinculada com a maior taxa ovulatória de fêmeas contemporâneas e com a variação prolongada no tempo de ovulação entre oócitos (Soede e Kemp, 1993).

Em estudo recente, Langendijk et al. (2016) compararam a mortalidade embrionária entre fêmeas suínas com os ovidutos ligados e fêmeas controle, em três estágios distintos de gestação (dia 9, dia 21, e dia 35). Foi demonstrado que independentemente do tratamento, 18% dos embriões não se implantaram, indicando mortalidade embrionária precoce durante o período de espaçamento e implantação (dias 12 a 14 de gestação). No entanto, ao aumentar o espaço disponível em fêmeas submetidas à ligadura, a segunda onda de mortalidade embrionária (dias 21 a 35) foi eliminada, em comparação com a ocorrência de 14% em fêmeas intactas, no mesmo período. Os resultados de Langendijk et al. (2016) estão de acordo com outros pesquisadores, enfatizando que diferentemente da primeira onda de mortalidade, a segunda está mais associada à falta de espaço uterino (Dziuk, 1968; Père et al., 1997; Town et al., 2004). É evidente que a área disponível para a expansão placentária é um fator limitante que diminui a absorção de nutrientes. No grupo controle, as placentas eram menores, e quase todo o espaço disponível era ocupado, deixando pouco espaço físico disponível para a área de implantação aumentar (Langendijk et al., 2016).

O uso de transcriptômica em estudos animais

Ferramentas genômicas de “alto rendimento” como “microarray” (microarranjos) e sequenciamento de próxima geração de RNA (RNA-seq) têm sido utilizadas para estudar a expressão gênica em relação à fisiologia reprodutiva de animais domésticos. Dentre outros fatores, essas tecnologias permitem uma análise mais aprofundada e melhor entendimento da relação entre o ambiente materno e desenvolvimento embrionário (Niemann et al., 2007; Tsoi et al., 2012; Dyck et al., 2014). Seja utilizando microarranjos ou RNA-seq, as mudanças na abundância de mRNA desencadeadas por certas condições uterinas podem ser caracterizadas nos conceitos.

A tecnologia de microarranjos permite estudos em larga escala de expressão gênica. No entanto, possui várias limitações, que incluem problemas como, por exemplo, “background hybridization” (a qual limita a acurácia das medidas de expressão), sondas com diferentes propriedades de hibridização, e o maior problema sendo relacionado ao fato de que os arranjos são limitados a analisar somente genes para os quais as sondas são projetadas e incluídas no arranjo (Zhao et al., 2014). O RNA-seq, por outro lado, é o sequenciamento direto das transcrições e não depende da anotação do genoma para seleção prévia na sonda. Desta forma, evita vieses presentes na hibridização pelo microarranjo. A técnica também oferece vantagens para detectar novas transcrições, expressões alélicas específicas e “splice junctions” (Mortazavi et al., 2008; Zhao et al., 2014).

O RNA-seq permite a quantificação precisa dos níveis de transcrição em tecidos e células e permite que os cientistas explorem como certos organismos respondem a certas condições (Gracey e



Cossins, 2003). Essa capacidade técnica permite que um perfil abrangente de expressão gênica possa ser identificado como ativo e inativo sob determinadas condições experimentais, tais como o uso de aditivos nutricionais (Dalto et al., 2015), ocorrência de infecção bacteriana (Fouhse et al., 2019) ou diferenças fisiológicas ou de desenvolvimento na reprodução de suínos (Tsoi et al., 2012, 2016). Esses estudos fornecem perfis detalhados de expressão genética relacionados com as vias moleculares adjacentes e interação entre genes a fim de desvendar as relações causais entre genes e condições fisiológicas particulares.

Considerações finais

A capacidade de elucidar aspectos relacionados à regulação do desenvolvimento embrionário e placentário e aos genes centrais e marcadores moleculares que estão relacionados ao adequado desenvolvimento e qualidade embrionária contribuem para a compreensão da reprodução básica e facilitam o entendimento das relações materno-embrionárias no período gestacional.

Agradecimentos

À Faculty of Agricultural, Life & Environmental Sciences, University of Alberta, Swine Research & Technology Centre, Alberta Agriculture and Forestry and Natural Sciences e ao Engineering Research Council of Canada.

Referências

- Anderson LL.** Reproduction in farm animals Pigs, 7th ed., p.182-191, 2000.
- Bazer FW.** Establishment of pregnancy in sheep and pigs. *Reprod Fertil Devel*, v.3, p.237-242, 1989.
- Bazer FW.** Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *J Anim Sci Biotechnol*, v.4, 23. 2013.
- Bazer BW, First, NL.** Pregnancy and parturition. *J Anim Sci*, v. 57(suppl_2), p. 425-460, 1983.
- Bazer FW, Johnson, GA.** Pig blastocyst–uterine interactions. *Differentiation*, v.87(1- 2), p.52-65, 2014.
- Bazer FW, Thatcher WW.** Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F₂α by the uterine endometrium. *Prostaglandins*, v.14, p.397-401, 1977.
- Boulot S, Quesnel H, Quiniou N.** Management of high prolificacy in French herds: can we alleviate side effects on piglet survival? *Adv Pork Prod*, v.19, p.213–220, 2008.
- Dalto DB, Tsoi S, Audet I, Dyck MK, Foxcroft, GR, Matte JJ.** Gene expression of porcine blastocysts from gilts fed organic or inorganic selenium and pyridoxine. *Reproduction*, v.149, p.31-42, 2015.
- Dyck MK, Zhou C, Tsoi S, Grant J, Dixon WT, Foxcroft GR.** Reproductive technologies and the porcine embryonic transcriptome. *Anim Reprod Sci*, v.149, p.11-18, 2014.
- Dyck MK, Ruvinsky A.** Developmental genetics. *The Genetics of the Pig* (Ed. 2), p. 263-305, 2011.
- Dziuk P.** Effect of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival. *J Reprod Fertil, Supplement*, 33, p.57-63, 1985.
- Dziuk PJ.** Effect of number of embryos and uterine space on embryo survival in the pig. *J Anim Sci*, v.27, p.673-676, 1968.
- Enders AC, Blankenship TN.** Comparative placental structure. *Adv Drug Deliv Rev*, v.38, p.3-15, 1999.
- Fléchon J, Degrouard J, Fléchon B.** Gastrulation events in the prestreak pig embryo: Ultrastructure and cell markers. *Genesis*, v.38, p.13-25, 2004.
- Ford SP, Vonnahme KA, Wilson ME.** Uterine capacity in the pig reflects a combination of uterine environment and conceptus genotype effects. *J Anim Sci*, 80(E-suppl_1), E66-E73, 2002.
- Fouhse J, Tsoi S, Clark B, Gartner S, Patterson J, Foxcroft GR, Dyck MK.** Outcomes of a low birth weight phenotype on piglet gut microbial composition and intestinal transcriptomic profile. *Can J Anim Sci*, v.100, p.47-58, 2019.
- Foxcroft GR, Vinsky MD, Paradis F, Tse W, Town SC, Putman CT, Dixon WT.** Macroenvironment effects on oocytes and embryos in swine. *Theriogenology*, v.68, p.30-39, 2007.
- Friess AE, Sinowatz F, Skolek-Winnisch R, Träutner W.** The placenta of the pig. I. Finestructural changes of the placental barrier during pregnancy. *Anat Embryol*, v.158, v.179-191, 1980.
- Geisert RD, Zavy MT, Moffatt, RJ Blair, RM Yellin, T.** Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil, Supplement* 40, p.293-305, 1990.



- Geisert RD, Schmitt R.** Early embryonic survival in the pig: Can it be improved? *J Anim Sci*, 80(E-suppl_1), E54-E65, 2002.
- Geisert RD, Brookbank JW, Michael Roberts R, Bazer, FW.** Establishment of pregnancy in the pig: II. cellular remodeling of the porcine blastocyst during elongation on day 12 of pregnancy. *Biol Reprod*, v.27, p.941-955, 1982.
- Geisert RD, Pratt TN, Bazer FW, Mayes JS, Watson GH.** Immunocytochemical localization and changes in endometrial progesterin receptor protein during the porcine oestrous cycle and early pregnancy. *Reprod Fertil Dev*, v.6, p.749-760, 1994.
- Goldstein MH, Bazer FW, Barron DH.** Characterization of changes in volume, osmolarity and electrolyte composition of porcine fetal fluids during gestation. *Biol Reprod*, v.22, p.1168-1180, 1980.
- Gracey AY, Cossins AR.** Application of microarray technology in environmental and comparative physiology. *Annu Rev Physiol*, v.65, p.231-259, 2003.
- Hill MA.** No title. UNSW Embryology. 2017. Primordial Germ Cell Migration Movie.
- Hunter RHF.** Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig, *Sus scrofa*. *Anat Rec*, v.178, p.169-186, 1974.
- Hunter RHF.** Physiological factors influencing ovulation, fertilization, early embryonic development and establishment of pregnancy in pigs. *Br Vet J*, v.133, p.461-464, 1977.
- Knight JW, Bazer FW, Thatcher WW, Franke DE, Wallace HD.** Conceptus development in intact and unilaterally hysterectomized-ovariectomized gilts: Interrelations among hormonal status, placental development, fetal fluids and fetal growth. *J Anim Sci*, v.44, p.620-637, 1977.
- Langendijk P, Chen TY, Athorn RZ, Bouwman EG.** Embryonic survival at day 9, 21 and 35 of pregnancy in intact and unilaterally oviduct ligated multiparous sows. *Animal*, v.10, p.1336-1341, 2016.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B.** Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, v.5(7), p.621-8. 2008.
- Niemann H, Carnwath JW, Kues W.** Application of DNA array technology to mammalian embryos. *Theriogenology*, v.68, p.165-77, 2007.
- Père MC, Dourmad JY, Etienne M.** Effect of number of pig embryos in the uterus on their survival and development and on maternal metabolism. *J Anim Sci*, v.75, p.1337-42, 1997.
- Pope CE, Christenson RK, Zimmerman-Pope VA, Day BN.** Effect of number of embryos on embryonic survival in recipient gilts. *J Anim Sci*, v.35, p.805-808, 1972.
- Pope WF.** Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biol Reprod*, v.39, p.999-1003, 1988.
- Pope WF, Maurer RR, Stormshak F.** Intrauterine migration of the porcine embryo: influence of estradiol-17 β and histamine. *Biol Reprod*, v.27, p.575-579, 1982.
- Pope WF, Xie S, Broermann DM, Nephew KP.** Causes and consequences of early embryonic diversity in pigs. *J Reprod Fertil*, v.40, p.251-260, 1990.
- Quiniou N, Dagorn J, Gaudré D.** Variation of piglets' birth weight and consequences on subsequent performance. *Livest Prod Sci*, v.78, p.63-70, 2002.
- Ross JW, Ashworth MD, Hurst AG, Malayer JR, Geisert RD.** Analysis and characterization of differential gene expression during rapid trophoblastic elongation in the pig using suppression subtractive hybridization. *Reprod Biol Endo*, v.1, p.1-2, 2003.
- Schneider JF, Nonneman DJ, Wiedmann RT, Vallet JL, Rohrer GA.** Genomewide association and identification of candidate genes for ovulation rate in swine. *J Anim Sci*, v.92, p.3792-803, 2014.
- Soede NM, Kemp B.** In synchronized pigs, the duration of ovulation is not affected by insemination and is not a determinant for early embryonic diversity. *Theriogenology*, v.39, p.1043-1053, 1993.
- Stenhouse C, Hogg CO, Ashworth CJ.** Novel relationships between porcine fetal size, sex, and endometrial angiogenesis. *Biol Reprod*, v.101, p.112-25, 2019.
- Steven DH. Comparative placentation. Essays in structure and function. Academic Press, Nova York p. 315. 1975.
- Stroband HW, Van der Lende T.** Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *J Reprod Fertil, Suppl.* v.40, p.261-277, 1990.
- Town SC, Putman CT, Turchinsky NJ, Dixon WT, Foxcroft GR.** Number of conceptuses in utero affects porcine fetal muscle development. *Reproduction*, v.128, p.443-454, 2004.
- Tsoi S, Blanes M, Chen TY, Langendijk P, Athorn R, Foxcroft G, Dyck M.** Identification of differentially expressed genes in sexed pig embryos during post-hatching development in primiparous sows exposed to differing intermittent suckling and breeding strategies. *Gen Data*, v.9, p.30-34, 2016.
- Tsoi S, Zhou C, Grant JR, Pasternak JA, Dobrinsky J, Rigault P, Nieminen J, Sirard MA, Robert C, Foxcroft GR, Dyck MK.** Development of a porcine (*Sus scrofa*) embryo-specific microarray: array



annotation and validation. *BMC genomics*, v.13, p.1-6, 2012.

Vallet JL, McNeel AK, Miles JR, Freking BA. Placental accommodations for transport and metabolism during intra-uterine crowding in pigs. *J Anim Sci Biotechnol*, v.5, p.1-4, 2014.

Wright EC, Miles JR, Lents CA, Rempel LA. Uterine and placenta characteristics during early vascular development in the pig from day 22 to 42 of gestation. *Anim Reprod Sci*, v.164, p.14-22, 2016.

Zhao S, Fung-Leung WP, Bittner A, Ngo K, Liu X. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PloS one*, v.9, e78644, 2014.
