

## **2. MADURACION DE OOCITOS *IN VITRO***

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

El desarrollo embrionario está fuertemente influenciado por los sucesos que ocurren durante la maduración. De hecho los primeros estadios del desarrollo embrionario están controlados exclusivamente por la información materna contenida en el oocito de origen. Por lo tanto el éxito o fracaso en la maduración del oocito es un paso altamente limitante en los procedimientos de producción de embriones *in vitro* (PIV) y de las técnicas de reproducción asistida (ART) en animales y en humanos.

En la actualidad la coneja, no sólo tiene interés como animal de producción, sino también en la investigación biomédica. La utilización de esta especie como modelo reproductivo data de finales del siglo XIX. En los años 90 se obtuvieron conejos introduciendo células embrionarias en oocitos enucleados por transferencia nuclear (NT). La transferencia de células somáticas (SCNT, Somatic Cell Nuclear Transfer) fue más difícil de conseguir en esta especie comparada con otras (vacuno y ovino, por ejemplo), no siendo hasta el 2002, cuando se obtuvo el primer clon de coneja mediante esta técnica. El éxito de la misma depende de la remodelación y de la reprogramación nuclear (metilación, acetilación...). La remodelación nuclear es diferente en el conejo comparado con otras especies como veremos a continuación. Está relacionada con los niveles de

MPF y MAPK en el ovocito, los cuáles a su vez determinan que la maduración nuclear y citoplasmática se realice adecuadamente. Sin embargo, este proceso, aún no está optimizado in vitro en la coneja. Por eso la mayoría de los estudios de producción de embriones en lagomorfos y para hacer SCNT utilizan ovocitos madurados in vivo, es decir, con una competencia mayor. Para ello, la hembra es sometida a un tratamiento de superovulación y recogiendo los ovocitos ovulados en el oviducto.

Así mismo, durante los últimos años ha incrementado considerablemente el número de investigadores que utilizan el embrión de la coneja como modelo experimental para estudiar las interacciones materno- embrionarias en múltiples trastornos alimentarios, metabólicos y enfermedades emergentes, como la diabetes o la obesidad y que producen infertilidad en las mujeres. En este sentido, el conejo es un excelente modelo para la medicina regenerativa y el estudio de enfermedades reproductivas o cardiovasculares, ya que presenta características bioquímicas y fisiológicas muy similares a las humanas. El gran tamaño de los embriones y las similitudes entre su placenta y la humana, proporcionan un modelo particularmente bueno para estudiar dichas interacciones materno- embrionarias- fetales de los trastornos ya mencionados.

---

## **MADURACIÓN DEL OOCITO**

En líneas generales la maduración de los oocitos implica dos procesos coordinados: una maduración nuclear y otra citoplasmática. Ambos son la culminación del desarrollo progresivo del oocito desde el inicio de la foliculogénesis y, a lo largo de ella, hasta la ovulación siendo imprescindibles para que se produzca la fecundación del mismo y el desarrollo de un embrión con normalidad.

### **Maduración nuclear**

El núcleo del oocito desde su formación en el periodo prenatal y durante el desarrollo folicular permanece quiescente en el estadio de Profase I (dictiatio) de la meiosis. La maduración nuclear se refiere a la progresión desde el estadio de dictiatio de la primera división meiótica (en la que estaba detenido el oocito) hasta el de metafase de la segunda división meiótica (Metafase II), con la extrusión del primer corpúsculo polar al espacio perivitelino. De esta manera se reduce el material genético del oocito a la mitad (de  $2n$  a  $n$ ), y se producen dos células hijas haploides: el oocito propiamente dicho, que conserva casi la totalidad del citoplasma, y el corpúsculo polar, que contiene prácticamente sólo la dotación cromosómica. Entonces el oocito se detiene de nuevo en estadio de Metafase II en el oviducto hasta que se produce la fecundación. En ese momento se completaría la meiosis produciéndose la extrusión del segundo corpúsculo polar. Este proceso se produce previamente a la ovulación del oocito en la mayoría de

las especies (aunque no en todas).

In vivo, el pico preovulatorio de la LH es el estímulo que desencadena la reanudación de la meiosis. En este momento las células del cúmulo producen ácido hialurónico que permite la expansión y la mucificación del mismo y como consecuencia la pérdida de las uniones “gap” o en hendidura entre las células del cúmulo y el oocito. De hecho, una de las diferencias morfológicas más llamativas entre un oocito inmaduro y uno maduro, antes y después de la maduración in vitro es la expansión del cúmulo celular. Desde hace muchos años se sabe que este proceso también se desencadena de forma espontánea cuando el oocito es aislado del folículo.

### **Maduración citoplasmática**

La maduración citoplasmática es un proceso que implica modificaciones post-transcripcionales del ARNm acumulado durante la oogénesis, y la re-localización y modificación de algunos orgánulos celulares en el oocito como las mitocondrias o los gránulos corticales, lo cual constituye una pieza clave del programa de maduración. Estos cambios se pueden visualizar utilizando distintas técnicas de tinción lo cuál nos permitirá valorar la calidad de la maduración en nuestro sistema de cultivo in vitro como veremos mas adelante.

---

## **PREPARACIÓN DEL LABORATORIO I**

La maduración in vitro intenta imitar en la medida de lo posible las condiciones ideales físico-químicas que el oocito tendría en su entorno folicular ovárico. Por ello las condiciones físicas del ambiente en el que maduran los oocitos así como la mayor o menor definición del medio de maduración van a ser determinantes en el resultado final del procedimiento.

Antes de realizar el proceso de maduración in vitro, o de cultivo in vitro de los embriones en el laboratorio hay que tener en cuenta una serie de recomendaciones:

### Preparación de los medios de cultivo

Para ello es necesario utilizar material estéril y preparar los medios de lavado y de cultivo bajo una campana de flujo laminar. Previamente se deja el material y el equipo a utilizar con la luz ultravioleta encendida (Imagen 1a). No se debe trabajar nunca con la luz UV encendida (Imagen 1b). Tampoco con luz normal directa ya que perjudica la viabilidad de los gametos y embriones.

Hay que comprobar que el pH de los medios con los que vamos a trabajar se encuentra en torno a 7,4 con un pHmetro (Imagen 2), que la osmolaridad del medio se encuentra en torno a 280 mOsm con un osmómetro y pesar cuidadosamente los componentes del medio con una balanza de precisión (Imagen 3).

Los medios de lavado y transporte de los ovarios deben estar previamente atemperados, para ello necesitaremos un baño maría (Imagen 4) y placas calefactoras para mantener la temperatura constante durante todo el proceso.

---

## **PREPARACIÓN DEL LABORATORIO II**

Los medios de cultivo y el tampón fosfato PBS donde se recogen los oocitos o embriones se deben filtrar con filtros especiales de 0,25 micras como se muestra en el video.

Todos los medios se deben preparar antes de tener los ovarios en el laboratorio.

---

## **PREPARACIÓN DEL LABORATORIO II**

### **2. Composición de los medios**

La composición de los medios de maduración es muy variada y depende de la especie y del laboratorio. Se han desarrollado desde soluciones simples de sales balanceadas hasta medios complejos y especializados, basándose en los elementos que están presentes en el folículo in vivo. El TCM-199 (Tissue Culture Medium) es una formulación compleja de aminoácidos, sales minerales, vitaminas, sustancias tampón, etc. Es uno de los medios comerciales más usados en todas las especies aunque existen otros como: MEM (Minimum Essential Media), Whitten's, KRB (Krebs Ringer Bicarbonato) o el medio NCSU (North Carolina State University) algunos de los cuales se suelen preparar en el propio

laboratorio o pueden ser comerciales. A su vez, los medios de cultivo se pueden suplementar con una gran variedad de componentes como gonadotropinas (FSH y LH), estradiol, células somáticas para co-cultivo, aminoácidos, factores de crecimiento (IGF-I, EGF, TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ), suero de vaca en estro, suero fetal bovino y albúmina sérica bovina (BSA) entre otros. La tendencia actual es, en la medida de lo posible, el uso de medios con suplementos definidos. De esta manera, no se presentan posibles factores desconocidos y variables que podrían interferir en la regulación de los procesos de estudio.

En el exterior se suele utilizar PBS con BSA o medios como el TCM-199 con HEPES (tampón). En el interior del incubador los medios suelen estar suplementados con tampón bicarbonato para mantener el pH.

En cualquier caso, los medios deben llevar antibiótico y se deben preparar y dejar en el incubador al menos dos horas antes de meter los oocitos a madurar para que se equilibren.

### **3. Condiciones ambientales**

La maduración se puede realizar en cultivos denominados “abiertos” o “cerrados”. Los primeros se realizan en placas de cultivo (de diámetro variable) mientras que los segundos se realizan superponiendo al medio aceite mineral, para minimizar las pérdidas de humedad, pH, temperatura y disminuir el riesgo de contaminación microbiana. Los cultivos abiertos se suelen realizar

normalmente en placas de cuatro “pocillos” con un número medio de 50 COC por pocillo. Los cultivos cerrados con aceite mineral suelen hacerse en microgotas con un número menor de oocitos por gota, o incluso individuales; en este último caso porque se quiera, por el motivo que sea, seguir específicamente el desarrollo y viabilidad de un oocito en particular o con un tratamiento específico.

El cultivo se ha de realizar en un incubador en unas condiciones ambientales estrictamente controladas. Por lo general se utiliza una atmósfera con un 20% de oxígeno y un 5% CO<sub>2</sub> en aire. Es necesario tener un riguroso control de la atmósfera utilizando un máximo de humedad relativa para prevenir la evaporación del medio. El mecanismo exacto por el cual el CO<sub>2</sub> ejerce su acción no se conoce, posiblemente tenga efecto sobre el pH intracelular, el cual se sabe que es un potente regulador del metabolismo.

La temperatura y el tiempo de maduración difieren según especies. Así la temperatura utilizada suele coincidir con la temperatura rectal de la especie y el tiempo de cultivo necesario para obtener oocitos en el estadio nuclear de MII es bastante aproximado al requerido in vivo. El tiempo de maduración in vitro utilizado normalmente es de 16 h en la coneja. En otras especies es de: 17h (ratona), 24h (vaca, oveja), 27h (cabra), 36-42 h (yegua) y 44h (cerda). Aunque se pueden encontrar variaciones según los laboratorios.

---

## **OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LOS OVARIOS**

La obtención de oocitos se puede realizar de ovarios de animales vivos o post mortem. Normalmente, la recuperación de oocitos post mortem se lleva a cabo en ovarios de animales sacrificados en matadero (Imagen 1) aunque también podemos obtener oocitos de folículos de animales superovulados para obtener un número más elevado de ellos (Imagen 2) , de animales que hayan muerto de forma fortuita (en peligro de extinción), para recuperar sus oocitos e intentar conseguir embriones in vitro, con el fin de conservarlos y/o transferirlos a hembras receptoras.

La fuente de oocitos procedentes de hembras sacrificadas en el matadero es la más utilizada en lagomorfos ya que presenta como ventaja la disponibilidad de un gran número de oocitos y la reducción de los costes de mantenimiento de los animales vivos. Sin embargo, uno de los grandes inconvenientes es que implica emplear oocitos de hembras que presentan una gran variabilidad de su estado fisiológico (edad, raza, fase del ciclo, etc.).

Uno de los parámetros más importantes durante la recogida de ovarios es mantener la temperatura estable, lo más cercana a 37°C durante todo el proceso. Esto se consigue utilizando termos (Imagen 3) que mantienen los ovarios atemperados en una solución salina fisiológica o tampón fosfato (PBS, Phosphate Buffer Solution) con antibióticos.

Otro factor importante es el tiempo que se tarda en llegar al laboratorio con los ovarios, que debe de ser el mínimo posible (se recomienda que sea entre 1 y 2 horas), ya que se ha demostrado que a medida que aumenta el tiempo va disminuyendo la viabilidad de los oocitos. Prácticamente en todas las especies hay estudios de viabilidad, señalando los tiempos máximos de recogida y transporte de los ovarios tras los cuales es posible realizar una maduración, fecundación y desarrollo embrionario in vitro en condiciones óptimas para poder conseguir descendencia. En la mayoría de estas especies, este tiempo no suele ser superior a las 8-10 horas; a partir de ahí, los oocitos no tienen una calidad adecuada para ser fecundados y desarrollados con normalidad y por lo tanto no se recomienda su utilización para la producción in vitro de embriones.

---

## **OBTENCIÓN DE OOCITOS**

Existen varias formas de obtener oocitos de los ovarios post mortem. Las más comunes son por aspiración folicular y disección de los ovarios o “slicing”.

### **Aspiración folicular I**

Esta técnica se basa principalmente en puncionar y aspirar el contenido de los folículos antrales visibles en la superficie del ovario con un cierto diámetro según la especie. En la coneja, según muestra el video se aspirará el contenido de los folículos antrales con un diámetro superior a 1mm. En otras especies como la vaca se aspiran folículos entre 2-8 mm y en la cerda este diámetro es de 3-7.

Existen multitud de estudios previos que constatan que la capacidad de desarrollo del oocito se incrementa conforme va aumentando el diámetro del folículo y que los oocitos más competentes se encuentran en los folículos del diámetro mencionado. Se entiende por oocitos competentes, aquéllos que tendrán una capacidad mayor para madurar *in vitro*, ser fecundados y dar lugar a un embrión de calidad.

---

### **Aspiración folicular II**

Con esta técnica se obtienen los oocitos rodeados de sus células del cúmulo. Estas estructuras recuperadas se denominan: complejos cúmulo-oocito (COC). La aspiración de los folículos, se realiza normalmente con agujas de distinto diámetro dependiendo de la especie (de 25G en coneja a 14 ó 16G en yegua) unidas a una jeringa o a una bomba de aspiración. La utilización de una bomba de aspiración implica que siempre se ejerza la misma presión al aspirar todos los folículos. Mediante jeringa hay que tener cuidado de no ejercer una presión negativa demasiado fuerte, ya que puede dañar los oocitos recuperados.

A continuación, el contenido aspirado (líquido folicular con los oocitos rodeados de sus células del cúmulo) se va depositando en un tubo atemperado. Durante el proceso de recogida, los oocitos se van sedimentando en el fondo del tubo. Posteriormente, se recoge el sedimento y se pone en placas de cultivo donde se buscarán y se seleccionarán los oocitos que serán madurados *in vitro*.

---

## **Dissección del ovario**

Cuando lo que necesitamos es un número mayor de oocitos, éstos se pueden obtener por “slicing” o disección de los ovarios. Esta técnica se utiliza igualmente para obtener oocitos de animales con ovarios demasiado pequeños para realizar la aspiración folicular de manera efectiva, como ocurre en la ratona. Es una técnica de elección en algunos laboratorios, alternativa a la aspiración. Se realiza con aguja o bisturí y consiste en hacer cortes seriados de todo el ovario para obtener oocitos procedentes de folículos en estadios diferentes de desarrollo y por lo tanto, no siempre competentes.

---

## **MANEJO Y LAVADO DE LOS OOCITOS RECUPERADOS**

Como se ha mencionado anteriormente, todo el procedimiento de búsqueda y selección se realiza bajo un microscopio esteroscópico y en condiciones de esterilidad, es decir, dentro de una campana de flujo laminar (Imagen 1a;1b). La temperatura debe estar en torno a los 37-38°C, dependiendo de la especie. Para ello, las placas de cultivo y los tubos se colocan sobre pletinas calefactoras que mantienen la temperatura constante de los COC durante todo el proceso (Imagen 1, flecha roja). A su vez, se recomienda realizar la selección de los COC y los lavados (Imagen 2a;2b) en el menor tiempo posible y no exponer los oocitos a la luz más de lo necesario, ya que las condiciones ambientales del laboratorio no son las óptimas para su viabilidad.

Hay numerosos dispositivos para el manejo de los oocitos que varían en función de las preferencias del técnico. En general, se utilizan pipetas que se manejan

con la boca, que son aquéllas en las que la pipeta está conectada a un tubo de plástico que se conecta a su vez con un filtro de jeringa, y una pieza que se introduce en la boca y con la que se controla la succión de los embriones en la pipeta (flecha negra, Imagen 3). Por otro lado, otro grupo de pipetas son las que se controlan con la mano que se acoplan distintos dispositivos de manipulación de embriones como pipetas, capilares, etc. (flecha roja, Imagen 3). El diámetro de la punta de la pipeta se puede regular con la llama de un mechero en el que se manipula una pipeta pasteur de vidrio que a su vez se acopla una pipeta de boca (Imagen 3).

---

### **SELECCIÓN DE LOS COMPLEJOS CÚMULO-OOCITO**

La población de oocitos obtenidos suele ser muy heterogénea en cuanto al tamaño, aspecto y morfología, y más aún si el material procede del matadero. Por lo tanto, la selección de los oocitos es una de las etapas más importantes en el proceso de maduración.

La selección de “los mejores” oocitos para ser puestos en el medio de maduración se realiza normalmente en base a criterios morfológicos de su citoplasma y del cúmulo celular que les rodea.

En función de su cúmulo celular, los oocitos se pueden dividir en diferentes grados dependiendo de la cantidad de células del cúmulo que los rodean. Normalmente se seleccionan los oocitos rodeados por un cúmulo compacto formado por varias capas de células, ya que presentan mayores porcentajes de maduración, fecundación y de desarrollo hasta el estadio de blastocisto, que los

que carecen de cúmulo (denudados) o los que están rodeados solamente por la corona radiata.

Independientemente de la especie de que se trate, el citoplasma del oocito debe ser como norma general, uniforme, sin roturas, vacuolas, ni signos de degeneración de ningún tipo. Las zonas pelúcidas deben de mantener su integridad.

En función de las células del cúmulo y apariencia del citoplasma normalmente los COC se dividen en 4 grados (Imagen):

- Grado 1: más de 4 capas de cúmulo completas y compactas con citoplasma homogéneo.
- Grado 2: oocitos como los del grado 1 pero con menos capas de cúmulo, con zonas oscuras.
- Grado 3: oocito prácticamente denudado. Citoplasma irregular.
- Grado 4: oocitos denudados y COC expandidos (sin conexión entre células).

Los oocitos seleccionados para el cultivo son los que tienen un grado 1 y 2.

El diámetro de los oocitos también condiciona su capacidad para madurar sin embargo, la medición del diámetro no es una técnica de rutina en la PIV, y en este caso de la maduración de oocitos *in vitro*.

---

## **VALORACIÓN DE LA MADURACIÓN I**

### **1. Maduración nuclear**

El grado de maduración nuclear alcanzado tras la maduración *in vitro* se puede determinar visualizando la configuración nuclear de los oocitos con distintos colorantes como la orceína acética (Imagen 1) o con fluorocromos, como el hoestch o el propidio iodado (imagen 2) para visualizar los cromosomas en un microscopio de campo claro o de fluorescencia respectivamente.

El grado de expansión de las células del cúmulo también nos indica que el reinicio de la meiosis se ha producido (Imagen 3)

---

## **VALORACIÓN DE LA MADURACIÓN II**

### **2. Maduración citoplasmática**

Existen numerosos métodos para determinar la calidad de los oocitos madurados *in vitro* y confirmar la validez de nuestro sistema de cultivo. Los métodos más frecuentes son:

- la valoración del grado de apoptosis en las células del cúmulo mediante la técnica de TUNEL (Imagen 1, en rojo se visualizan los núcleos de todas las células del cúmulo; en verde, sólo las células apoptóticas) o de la anexina V
- el análisis de la expresión génica (mediante PCR cuantitativa, qPCR (del inglés quantitative polymerase chain reaction) RT-PCR en tiempo real (del inglés real time PCR) y de proteínas (mediante Wester Blot)
- la capacidad de sobrevivir a la congelación/ descongelación

- la localización de las organelas durante la maduración se puede determinar mediante tinciones con distintos fluorocromos y observación en un microscopio confocal o mediante microscopía electrónica.
- La imagen 2 muestra el patrón de distribución mitocondrial en oocitos de coneja (en rojo) obtenidos en un microscopio confocal. La dotación mitocondrial del embrión proviene de la madre, y las primeras divisiones dependen del ATP producido por las mitocondrias maternas. Por lo tanto, una alteración en la distribución o en el número de mitocondrias durante la maduración implica un desequilibrio en el suministro de ATP del oocito que da lugar a fallos en la segregación de los cromosomas, en la fecundación y en el desarrollo embrionario entre otros (Van Blerkom, 2011).
- La imagen 3 muestra la distribución de los gránulos corticales en la coneja (en verde) obtenidos en un microscopio confocal. La migración de los gránulos corticales (GC) se produce hacia la periferia del oocito distribuyéndose en una monocapa por debajo de la membrana plasmática, preparándose así para el momento de la fecundación (Wang *et al.*, 1997). La función principal de los gránulos corticales reside en su capacidad para bloquear la poliespermia durante la fecundación del oocito mediante la reacción cortical.

Existen muchas formas de evidenciar cromosomas y organelas en el citoplasma, sin embargo, la habilidad del oocito para desarrollarse a blastocisto es el mejor indicador de que la maduración citoplasmática se ha realizado adecuadamente.

La prueba definitiva es la transferencia del embrión desarrollado a una hembra receptora y la capacidad de desarrollo y formación de un nuevo individuo sano.

---

## **RECOGIDA DE EMBRIONES**

### **1. Disección del tracto reproductor**

Los embriones se pueden recoger de forma quirúrgica mediante laparoscopia o mediante laparotomía media-ventral. Si se utiliza esta última técnica, las hembras son anestesiadas primeramente. En la coneja, se puede realizar la recogida de embriones mediante lavado del tracto reproductor del animal tras el sacrificio.

Primeramente hay que eliminar toda la grasa del tracto reproductor como muestra el vídeo

---

## **RECOGIDA DE EMBRIONES**

### **2. Lavado del tracto reproductor**

Los embriones se recogen perfundiendo cada oviducto. Se introduce una aguja naranja en la zona proximal del oviducto (la ampolla oviductal) y se perfunde con una solución atemperada de PBS + 0,2% de Albúmina Sérica Bovina (BSA, Bovine Serum Albumin) y antibióticos en dirección al útero donde se recogerán los embriones en un recipiente., en esta caso utilizamos un tubo falcon.

Es importante mantener la solución de lavado atemperada. Por ello se realiza todo el procedimiento sobre una pletina calefactora a 38°C.

---

## **RECOGIDA DE EMBRIONES**

### **3. Recuento de cuerpos lúteos**

Es importante hacer el recuento de los cuerpos lúteos formados en cada ovario ya que nos permite estimar cuántos embriones debemos recuperar en cada cuerno uterino. En el vídeo se pueden contar 7 CL recientes. En la coneja los cuernos uterinos están separados completamente por lo tanto, el recuento de cuerpos lúteos en un ovario corresponde a los embriones que podemos encontrar en el cuerno ipsilateral.

---

## **RECOGIDA DE EMBRIONES**

### **4. Recuperación de los embriones**

Una vez finalizado el tracto reproductor, el contenido del filtro, del pocillo de recogida o del tubo falcon se vacía en una placa de Petri para buscar los embriones, utilizando un microscopio estereoscópico. Para grandes volúmenes de recogida es útil emplear placas de Petri con cuadrícula, que ayudan a guiarse a la hora de la búsqueda de los embriones. Los embriones, según se van encontrando, son pasados rápidamente con el menor volumen posible de medio a otras placas más pequeñas. El medio de dichas placas será la misma solución tampón fosfato con antibióticos y suero o BSA que se ha utilizado en el lavado, atemperada a 37°C. Como hemos visto anteriormente hay numerosos dispositivos para el manejo de los embriones que varían en función de las preferencias del técnico. Para el manejo de los embriones en general, se utilizan

el mismo material descrito para la manipulación de oocitos. En este caso se ha elegido usar la pipeta de mano para la recuperación y el lavado de los embriones.

---

## **RECOGIDA DE EMBRIONES**

### **4. Lavado de embriones y estadios morfológicos de desarrollo**

Después de realizar el lavado de los embriones (Imagen 1a; 1b) nos podemos encontrar con distintos estadios morfológicos del desarrollo:

Embrión pre-compactado: durante este periodo se inicia la división celular y en el estadio de 8 células se activa el genoma embrionario.

Mórula: se pueden diferenciar embriones en estadio de mórula temprana (16 células) o mórula compacta (32 células o más) (Imagen 2a). La compactación coincide con el establecimiento de las primeras uniones celulares y se considera un fenómeno imprescindible para el proceso de cavitación posterior en el cuál se produce la entrada de agua y  $\text{Na}^+$  que permiten que se forme una cavidad en el seno del embrión y que es una de las características del siguiente estadio embrionario.

Blastocisto: después de la cavitación de la mórula (Imagen 2b), los embriones se desarrollan a blastocisto (Imagen 2c); entran en un proceso de crecimiento y expansión que da lugar a dos tipos de poblaciones embrionarias diferenciadas: el trofoblasto y el botón embrionario separados por el blastocele. Es en este periodo el blastocisto expandido (Imagen 2d) cuando disminuye el grosor de la zona pelúcida, para que el embrión se pueda implantar adecuadamente en torno al día 7. En este momento el blastocisto puede medir hasta 6 mm de diámetro (Imagen 2e).

Una característica diferencial de la coneja, es que las secreciones oviductales forman una capa de mucina formada por mucopolisacáridos, que rodea a los embriones a su paso por el oviducto a partir de las 20h post-coito (Imagen 2, flecha negra) La presencia de la capa de mucina y su grosor (mínimo de 20  $\mu\text{m}$ ) son dos factores necesarios para la implantación correcta del embrión (Murakami e Imai, 1996).

---