

# ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN RATONES (*MUS MUSCULUS*) EN CENPALAB

Standardization of the assisted reproduction technique  
embryo transfer in mice (*Mus musculus*) at CENPALAB

 Randy Alvarez Fiallo\*,  Nidia Fernández Esperón,  Dasha Fuentes Morales

*Dirección de Animales Gnobióticos. Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorios (CENPALAB).  
Calle 3ra., No. 40759, entre 6ta. y Carretera de Tirabeque, Reparto La Unión, Municipio Boyeros, La Habana, Cuba.*

**RESUMEN:** El presente trabajo se propuso como objetivo estandarizar la transferencia de embriones (TE) en las condiciones del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Para lograrlo, se definió la técnica quirúrgica óptima para introducir los embriones de dos células en el oviducto, se evaluó el efecto de las líneas B6D2F1, OF1 o NMRI como receptoras y se evaluó el impacto de la edad de las receptoras, utilizando el porcentaje de gestaciones y la cantidad de crías nacidas como indicadores de éxito. Se comprobó que para introducir los embriones al oviducto, se pueden utilizar tanto la técnica quirúrgica de Whittingham (1968) como la de Nakagata (1992) y que se pueden transferir embriones utilizando indistintamente hembras receptoras de las líneas B6D2F1, OF1 o NMRI con una edad óptima de 11 a 14 semanas. Como conclusión se puede afirmar que se logró estandarizar la técnica de TE en las condiciones del CENPALAB, lo cual tiene gran importancia porque permite su introducción en la producción de ratones, facilitando el mantenimiento de líneas con dificultades para la reproducción, a la vez que posibilitará la aplicación del procedimiento de rederivación y la introducción de nuevas técnicas como la fertilización *in vitro* y la criopreservación de embriones.

**Palabras clave:** Reproducción asistida, transferencia de embriones, estandarización, ratones.

**ABSTRACT:** The present study aimed to standardize embryo transfer (ET) protocols under CENPALAB's working conditions. Surgical technique for two-cell embryo transfer into the oviduct, the assessed recipient strain effects (B6D2F1, OF1, and NMRI mice) and recipient age impact were evaluated using gestation percentage and live birth count as success parameters. These results demonstrate that embryo transfer to the oviduct can be successfully performed using either the Whittingham (1968) or Nakagata (1992) surgical techniques. Furthermore, recipient females from B6D2F1, OF1, or NMRI strains showed equivalent efficacy when used at their optimal reproductive age (11-14 weeks). It can be confirmed the embryo transfer protocol was successfully standardized at CENPALAB. This milestone is particularly valuable because it: (i) allows integration into routine mice production, (ii) supports maintenance of reproduction-compromised strains, and (iii) establishes the technical basis for future applications including rederivation processes, *in vitro* fertilization, and embryo cryopreservation techniques.

**Key words:** Assisted reproduction techniques, embryo transfer, standardization, mice.

El desarrollo de las ciencias biológicas ha requerido el empleo de animales de laboratorio como modelos de enfermedades, con fines de investigación y experimentación. El ratón constituye uno de los biomodelos más utilizados, ya que proporciona ventajas excepcionales: se aparea con bastante frecuencia produciendo camadas regularmente grandes; se desarrolla con rapidez, completa su ciclo de vida en aproximadamente dos años y comparte alrededor del 95% del genoma humano, además de poseer una extraordinaria habilidad para tolerar la consanguinidad y la manipulación genética compleja (1). Estas ventajas han conducido a la generación

masiva de cientos de miles de líneas de ratones diferentes, complejizando su crianza y mantenimiento *in vivo* (2).

Las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) han sido usadas ampliamente en ratones de laboratorio, contribuyendo al desarrollo, mantenimiento y reproducción de las diferentes líneas. Estas técnicas son implementadas en la mayoría de los bioterios para eliminar la contaminación con agentes indeseables, mejorar el rendimiento reproductivo de líneas con dificultad para la reproducción, y en algunos casos para el manejo y la preservación genética de colonias (3).

\*Correspondencia a: Randy Alvarez Fiallo. E-mail: [ralvarezfiallo@gmail.com](mailto:ralvarezfiallo@gmail.com)

Recibido: 08/01/2025

Aceptado: 07/04/2025

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

**Contribución de autores:** Randy Alvarez Fiallo: curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, escritura - borrador original, redacción: revisión y edición. Nidia Fernández Esperón: Conceptualización, curación de datos, supervisión. Dasha Fuentes Morales: Conceptualización, curación de datos, metodología, administración del proyecto, supervisión, escritura - borrador original, redacción: revisión y edición.



Las principales TRA tienen como paso final y de mayor importancia la transferencia de embriones (TE) (3). Se han descrito diferentes protocolos relacionados con los factores que influyen en la eficacia de esta técnica (4-8), sin embargo, comúnmente se producen tasas de preñez inestables debido principalmente a las limitaciones de equipamiento y la necesidad del dominio de sofisticadas técnicas de transferencia (3). Por esta razón, cada vez que dicha técnica se va a introducir en un laboratorio resulta necesario estandarizarla, teniendo en cuenta las condiciones específicas de cada lugar donde será empleada y la gran precisión y habilidad manual que requiere por parte de los operarios.

El Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorios (CENPALAB) es la institución encargada de la reproducción y el mantenimiento de los animales de laboratorio en Cuba, sin embargo, en ocasiones los ratones presentan problemas reproductivos o se deben cambiar de una instalación a otra, lo que requiere la aplicación de TRA, pero hasta el momento no se han podido aplicar porque no se ha logrado estandarizar la TE en las condiciones del centro. Por esa razón, el presente trabajo se propuso como objetivo estandarizar la técnica de transferencia de embriones en las condiciones de CENPALAB mediante la definición de la técnica quirúrgica a emplear, la determinación de la edad óptima de las receptoras y la evaluación del efecto de la línea de las receptoras.

El estudio se realizó con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CENPALAB. Se emplearon ratones producidos en CENPALAB, hembras y machos, con calidad microbiológica SPF (Libres de Gérmenes Patógenos Específicos, del inglés *Specific Pathogen Free*), mantenidos en salas protegidas o aisladores, pertenecientes a la Dirección de Roedores Gnotobióticos.

Se utilizaron como donantes 170 hembras de la línea Cnp:OF1 con una edad promedio de 11 semanas, las cuales se aparearon con 36 machos de la misma línea y edad, en horas de la tarde y se mantuvieron durante 19 horas en una relación 5:3. Al día siguiente, en horas tempranas, se revisó la presencia de tapón vaginal para identificar las cópulas y seleccionar las hembras donantes. A las hembras seleccionadas, 40 horas después del apareamiento, se les practicó la eutanasia y se colectaron los embriones en dos células, los cuales fueron mantenidos en medio M2 (M7167;

Sigma, EE.UU) dentro de una incubadora (Heraus, Hanau, Alemania) a 37°C hasta el momento de la transferencia.

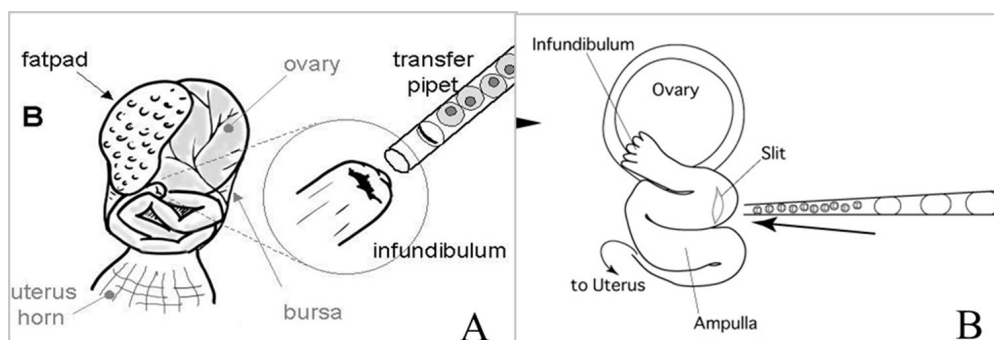
Las hembras receptoras pseudogestadas se obtuvieron a partir de 120 hembras de las líneas B6D2F1Cnp, Cnp:OF1 y Cnp:NMRI y 20 machos de la línea B6D2F1Cnp de 11 semanas de edad, vasetomizados. Los apareamientos se realizaron en el horario de la tarde, en una relación 3:1 y al día siguiente, en horas tempranas, se revisó la presencia de tapón vaginal para identificar las cópulas.

Para definir la técnica quirúrgica se emplearon 50 hembras receptoras de la línea B6D2F1Cnp, divididas en dos grupos de 25 animales cada uno. En el primero se aplicó la técnica descrita en el método Whittingham (6), que consiste en cortar la bolsa ovárica que rodea el oviducto, permitiendo el acceso al infundíbulo, donde se introduce la punta del microcapilar cargado con los embriones, los cuales se depositan en el interior del oviducto. En el segundo grupo se aplicó el procedimiento descrito por Nakagata (4), realizando una incisión pequeña en la pared del oviducto, entre el infundíbulo y el ampulla tubárica, se insertó el capilar dentro y se liberaron los embriones en el interior del oviducto en dirección al ampulla (Figura 1).

Para determinar la edad óptima de las receptoras se emplearon 29 hembras de la línea B6D2F1Cnp, formando un primer grupo de 10 hembras, de 8 a 10 semanas de edad y un segundo grupo con 19 hembras, de 11 a 14 semanas de edad.

Para la evaluación del efecto de la línea de la receptora, se emplearon 19 hembras de la línea B6D2F1, 11 hembras de la línea OF1 y 10 hembras de la línea NMRI, todas de 11 a 14 semanas de edad.

**Condiciones de mantenimiento de los animales.** Los animales se alojaron en cajas plásticas de policarbonato tipo T2, con tapas de rejillas de acero inoxidable, cambiables, ubicados en estantes de acero inoxidable. Como material de encamado se utilizó bagazo de caña de azúcar previamente desmeollado (AZCUBA, La Habana, Cuba). El agua se suministró en biberones de policarbonato de 500 mL, con pipeta de acero inoxidable, mientras que el alimento fue pelletizado, fórmula EMO 1004 (CENPALAB, La Habana, Cuba), y colocado en la tolva de la caja. Todos estos materiales fueron esterilizados mediante autoclave (GETINGE, Gothenburg, Suecia) a 121°C durante 20 minutos y suministrados a voluntad.



**Figura 1.** Representación esquemática de la técnica quirúrgica para depositar los embriones en el oviducto. A. Técnica descrita por Whittingham (6). B. técnica descrita por Nakagata (4). / *Schematic representation of the surgical technique for embryo deposition into the oviduct. A. Technique described by Whittingham (6). B. Technique described by Nakagata (4).*

**Condiciones ambientales.** Las cajas fueron colocadas en una sala con parámetros ambientales controlados automáticamente: temperatura  $21 \pm 3^\circ\text{C}$ , humedad relativa de 65 a 80% y un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad según lo descrito en los Procedimientos Operacionales de Trabajo de CENPALAB.

Como anestesia se utilizó la mezcla de ketamina (AICA, La Habana, Cuba), atropina (AICA, La Habana, Cuba) y diazepam (AICA, La Habana, Cuba), en una proporción de 10:8:4.

En todos los grupos se determinó el total de embriones transferidos, el total de hembras transferidas, la cantidad de hembras gestadas y la cantidad de crías nacidas. Con esos valores se calculó la eficacia y la eficiencia de la técnica mediante las fórmulas:

Eficacia:  $(\text{Número de partos} / \text{Número de hembras transferidas}) * 100$

Eficiencia:  $(\text{Total de crías nacidas} / \text{Total de embriones transferidos}) * 100$

Se empleó el paquete estadístico Minitab 20 (Minitab IncorWindows, 2020) con un nivel de confianza del 95% (alfa 0,05). Se determinó la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Levene y la normalidad de los datos con el empleo de Kolmogorov Smirnov; en los casos que se cumplieron ambas condiciones, se aplicaron pruebas paramétricas (T de Student o ANOVA de un factor) para comparar la cantidad de crías nacidas entre grupos y la eficiencia individual de las hembras paridas, mientras que en caso contrario se empleó un método no paramétrico (Mann-Whitney). Además, se aplicó la prueba de Chi Cuadrado para comparar la eficacia de la técnica.

El método quirúrgico para introducir los embriones en el oviducto puede influir considerablemente en los resultados, dependiendo de la habilidad del operario para realizar uno u otro método. Al comparar los resultados obtenidos con las técnicas de Whittingham (6) y Nakagata (4), se comprobó que el abordaje quirúrgico no influye en la eficacia, la cantidad de crías nacidas ni la eficiencia (Tabla 1), lo que demuestra que podrían ser utilizados indistintamente ambos métodos, en dependencia de las habilidades y comodidad de quien desarrolla la técnica.

Whittingham (1968) obtuvo un 33% de eficacia y un 30 % en la eficiencia al depositar los embriones en el oviducto a través del infundíbulo (6). Resultados similares fueron obtenidos por Petterset *al.* (9) y por Garcia *et al.* (10). El método quirúrgico de Nakagata (4) también ha sido ampliamente usado con resultados semejantes a los descritos en el presente estudio (5, 8, 11). Sin embargo, Nakagata (4) al utilizar tanto el método Whittingham (6) como el descrito por él, obtuvo valores significativamente mayores que todos los anteriores (eficacia del 100% y eficiencia de 60-65%), sin que se afectaran los resultados al variar el método, lo que demuestra el impacto del resto de los factores involucrados en la técnica, como por ejemplo: el equipamiento, la superovulación para obtener hembras pseudogestadas, la selección de las receptoras, la cantidad de embriones transferidos y otros (5).

De forma general, se puede afirmar que, a pesar de que ambas técnicas aportan resultados semejantes, la técnica quirúrgica de Nakagata (4) es más sencilla al visualizar el área por donde se van a introducir los embriones en el oviducto ya que solo se necesita identificar la ampolla tubárica, la cual estará dilatada debido a la pseudogestación. Además, no hay que abrir la bolsa ovárica, por lo que el riesgo de provocar sangrado a ese nivel es muy bajo, lo cual influye en la calidad de los resultados. Por el contrario, la técnica de Whittingham (6) requiere de mayor entrenamiento para localizar el infundíbulo, el cual es más complicado de visualizar y penetrar que la ampolla tubárica y la pared del oviducto. Por estas razones, a los que se inician en la TE, se recomienda utilizar la técnica de Nakagata (4) y en la medida que aumente su entrenamiento y habilidades, practicar la técnica de Whittingham (6) para finalmente decidir con qué método desarrollarán cada una de las transferencias.

Al estudiar el efecto de la edad de las receptoras, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la eficacia de la técnica (Tabla 2), al aplicar la prueba Chi cuadrado ( $p=0,029$ ), con los mejores resultados para las receptoras de 11 a 14 semanas; sin embargo, en el análisis de las crías nacidas (CN) y la Eficiencia, mediante las pruebas T de Student y Mann-Whitney, respectivamente, no se detectaron desigualdades estadísticas entre los grupos ( $p>0,05$ ), lo cual podría atribuirse a la reducida cantidad de partos que se produjeron.

**Tabla 1.** Resultados de las transferencias de embriones de ratones empleando las técnicas de Whittingham (6) y Nakagata (4). / *Results of mice embryo transfers using Whittingham (6) and Nakagata (4) techniques.*

Técnica	Hembras	Embriones Transferidos	Partos	Eficacia	CN	Eficiencia
Whittingham	25	462	18	72%	138	30%
Nakagata	25	446	19	76%	145	33%

CN: Crías nacidas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la eficacia (Chi-cuadrado)  $p>0,05$  en las CN ni en la Eficiencia (T de Student)  $p>0,05$ .

**Tabla 2.** Resultados de las transferencias de embriones en dos grupos de receptoras de edades distintas. / *Results of embryo transfers in two recipient female groups with different ages.*

Edad	Hembras	Embriones Transferidos	Partos	Eficacia	CN	Eficiencia
8 - 10 semanas	10	190	4	40%	27	14,21%
11 - 14 semanas	19	349	13	68,42%*	103	29,51%

\*Diferencias estadísticamente significativas en la Eficacia, prueba Chi cuadrado ( $p=0,029$ ); no se encontraron diferencias significativas en las Crías Nacidas ni en la Eficiencia,  $p>0,05$  (Pruebas T de Student y Mann-Whitney, respectivamente).

La influencia de la edad de hembras jóvenes como receptoras en la TE ha sido poco estudiada; la mayoría de las publicaciones contrasta hembras jóvenes (2 a 7 meses) y viejas (13 a 24 meses de edad), demostrando que el envejecimiento produce un declive en la reproducción, donde las receptoras de más de 13 meses tienen menor capacidad de mantener la preñez que las hembras jóvenes (11).

En el presente estudio se compararon los resultados al utilizar hembras de 8 a 10 y de 11 a 14 semanas, encontrando los mejores resultados cuando se emplearon hembras de 11 a 14 semanas de edad, lo cual se atribuye a que la hembra de ratón alcanza la pubertad a las 8 semanas (2); pero la edad, el peso y la acumulación de reservas corporales están estrechamente relacionados con la capacidad de la hembra de mantener y llevar a término la gestación (12). Estos hallazgos sugieren que para obtener los mejores resultados se deben usar hembras receptoras de 11 a 14 semanas de edad, y coinciden con lo referido por otros autores, quienes encontraron los mayores índices de éxito utilizando hembras de más de 10 semanas de edad (5, 11, 13).

Respecto al uso de las reproductoras B6D2F1, OF1 y NMRI como receptoras (Tabla 3), se comprobó que se pueden emplear, indistintamente, hembras de cualquiera de estas líneas sin que se afecten los resultados, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, mediante Chi cuadrado y ANOVA de un factor, para los indicadores evaluados.

Estos resultados tienen gran importancia y corroboran que la TE se puede aplicar independientemente del genofondo de la hembra receptora ya que no requiere histocompatibilidad entre las crías y la hembra receptora (5, 13). En el presente estudio se transfirieron embriones de la línea no consanguínea OF1 a otra línea no consanguínea (NMRI) y a la línea híbrida B6D2F1, sin que se detectaran diferencias significativas en la cantidad de partos y de crías nacidas.

Estos resultados coinciden con lo descrito anteriormente por otros autores (5, 13) sobre las ventajas del uso de animales no emparentados como receptoras ya que esos individuos tienen como rasgo sobresaliente el vigor híbrido, por lo cual presentan un estado físico superior y una mayor adaptabilidad al medio. Además, estas líneas son muy buenas reproductoras, capaces de lograr camadas de gran tamaño (2, 14). Al no observarse diferencias relevantes entre las líneas evaluadas, se facilita la selección de hembras receptoras, permitiendo el uso indistinto de cualquiera de ellas según la disponibilidad, sin comprometer la eficacia de la técnica.

La estandarización de la TE en las condiciones de CENPALAB tienen gran importancia ya que abre las

posibilidades de uso de esta metodología para eliminar posibles contaminaciones con agentes indeseables mediante la rederivación (3, 15, 16); mejora el rendimiento reproductivo de líneas con dificultad para la reproducción y en algunos casos para el manejo y la preservación genética de colonias (3), a la vez que permitirá la introducción de otras técnicas de reproducción asistida, entre ellas la fertilización *in vitro* y la criopreservación, lo cual posibilitará evitar la pérdida de biomodelos y el mantenimiento de bancos genéticos congelados de líneas de baja demanda (17, 18).

Con la aplicación de esta técnica se verá favorecida la calidad genética y la importación de nuevas líneas de modelos murinos mediante la adquisición de espermatozoides o de embriones congelados. La introducción de estas TRA posibilitará también la creación de un banco de embriones congelados, donde podrán mantenerse líneas valiosas de animales con manipulaciones genéticas tales como modelos transgénicos, animales *knockout* y *knock in*. Este banco de embriones además, podrá proporcionar los modelos de interés a otros países, fundamentalmente de América Latina y el Caribe, contribuyendo a la integración de la región y al desarrollo de proyectos de colaboración de alto impacto para la salud humana y animal.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró estandarizar la transferencia de embriones, comprobando que se pueden utilizar indistintamente las técnicas quirúrgicas de Whittingham (6) o Nakagata (4) y receptoras de las líneas NMRI, OF1 y B6D2F1 sin que se afecten los resultados, con una edad óptima para las receptoras de 11 a 14 semanas de edad.

## REFERENCIAS

1. Citra Nur M, Tyagita H, Ronny L. *Kajian Pustaka. Use of mice as experimental animals in laboratories that refer to the principles of animal welfare: a literature review.* Indonesia Medicus Veterinus. 2021; 10 (1): 134-145.
2. Suckow M. A., Hashway S, Pritchett-Corning, K. R. *The laboratory mouse* 3er ed, CRC press; 2023.
3. Santos Lamas SC. *Mouse embryo rederivation and other assisted reproductive techniques and their impact on experimental results.* Doctoral dissertation. Porto: Universidade do Porto. 2021
4. Nakagata N. Embryo transfer through the wall of the fallopian tube in mice. *Exp Anim.* 1992;41(3):387-388.
5. Lamas S, Franquinho F, Morgado M, Mesquita JR, Gärtner F, Amorim I. C57BL/6J and B6129F1 embryo transfer: unilateral and bilateral transfer, embryo number and recipient female background control for

**Tabla 3.** Resultados de las transferencias de embriones empleando hembras receptoras de diferentes líneas. / *Results of embryo transfers using recipient females from different strains.*

Línea	Hembras	Embriones Transferidos	Partos	Eficacia	CN	Eficiencia
OF1	11	208	11	100%	86	41,34%
B6D2F1	19	349	13	68,42%	103	29,51%
NMRI	10	181	9	90%	67	37%

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en la Eficacia, prueba Chi cuadrado; las Crías Nacidas ni en la Eficiencia entre los grupos, pruebas ANOVA.

- the optimization of embryo survival and litter size. *Animals*. 2020;10(8):1424.
6. Whittingham DG. Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature*. 1968;220(5167):592-593.
  7. Maurya VK, DeMayo FJ, Lydon JP. Illuminating the black box of progesterone dependent embryo implantation using engineered mice. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021;9:640907. doi: [10.3389/fcell.2021.640907](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640907).
  8. Auer KE, Kolbe T, Laschalt C, Rüllicke T. Comparison of unilateral and bilateral embryo transfer in mice. *Laboratory animals*. 2023;57(4), 424-431.
  9. Petters RM, Johnson BH, Mercer WE. Production of transgenic mice following deoxyribonucleic acid microinjection and embryo freezing. *Theriogenology*. 1987;27(3):507-515.
  10. Garcia Y, Sanchez MA. Introducción en el manejo y obtención de embriones de ratón para su modificación genética. *FarmaJournal*. 2016;1(2):133-142.
  11. Talbert GB, Krohn PL. Effect of maternal age on viability of ova and uterine support of pregnancy in mice. *Reproduction*. 1966;11(3):399-406.
  12. Hopper RM. *Boovine Reproduction*. 2da ed. JhonWiley&SonsInc; 2021.
  13. Rose C, Schwegler H, Hanke J, Yilmazer-Hanke DM. Pregnancy rates, prenatal and postnatal survival of offspring, and litter sizes after reciprocal embryo transfer in DBA/2JHd, C3H/HeNCrl and NMRI mice. *Theriogenology*. 2012;77(9):1883-1893.
  14. Eaton ON. Heterosis in the performance of mice. *Genetics*. 1953;38(6):609.
  15. Kim H, Bang J, Baek SH, Park, JH. Eliminating murine norovirus, *Helicobacter hepaticus*, and intestinal protozoa by embryo transfer for an entire mouse barrier facility. *Experimental animals* 2022;71(1), 28-35.
  16. Qianqian WANG, Sijue TAO, Zhen WEI, Huihui JIN, Ping LIU, Lie WANG. A Case Study of Using Assisted Reproductive Technology to Rescue Genetically Modified Mice with Reproductive Disorder Phenotypes. *Laboratory Animal and Comparative Medicine*. 2025;45(1), 79.
  17. Hart-Johnson S, Mankelov K. Archiving genetically altered animals: a review of cryopreservation and recovery methods for genome edited animals. *Laboratory Animals*. 2022;56(1), 26-34.
  18. Takeo T, Nakao S, Nakagawa Y, Szein JM, Nakagata N. Cryopreservation of mouse resources. *Laboratory Animal Research*. 2020;36: 1-6.