



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Optimization of post-cervical insemination in gilts and development of a new method of deep intra-cervical insemination based on the study of the reproductive system

Optimización de la inseminación post-cervical en cerdas nulíparas y desarrollo de un nuevo método de inseminación intra-cervical profunda basado en el estudio del aparato reproductor

D. Pedro José Llamas López
2020

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Con la exposición de esta tesis doctoral finalizo, de momento, mi trayectoria académica. En el año 2012 tuve el acierto y la suerte de cursar el Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción de Mamíferos, ofrecido e impartido por la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, el cual me permitió fortalecer y consolidar mis conocimientos en reproducción porcina, lo que me ha ayudado a crecer como profesional. Por otro lado, mi paso como alumno del Máster, me permitió conocer y aprender de un gran equipo de investigadores que forman parte del Departamento de Fisiología, y donde rápidamente creé una gran relación de amistad y profesionalidad con uno de sus integrantes, Fran. Esta simbiosis creada entre nosotros nos ha permitido unir el punto de vista del trabajo de campo y el de laboratorio, lo que nos ha permitido, o al menos intentar, ayudar a mejorar el manejo reproductivo en el sector porcino. No puedo olvidar a Octavio, una persona maravillosa que me ha aportado grandes valores.

El cariño y apoyo recibido por mi esposa, Rosario, y por mis hijos, como en cada etapa de mi vida, ha sido el pilar necesario para poder llevar a cabo mis metas académicas.

No quiero dejar de agradecer la ayuda y apoyo necesario para poder dedicar lo necesario a la realización de mis estudios, a mi jefe Juan Morell.

Y no me quiero olvidar a otras muchas personas que han confiado y siguen confiando en mi como profesional, mostrándome continuamente un gran respeto y amistad, como Juan Sans, Pedro Alonso, Ramón Corderroua, Antonio Guerrero, Jaime Sánchez, Mateo Martínez, Raul Sánchez, Pedro Ignacio Barnes, Miguel José López, Paula Sánchez, Luis Cano, y seguro que otros muchos que me dejo por mencionar en este momento.

Y por último a todas las personas y empresas que me han facilitado sus recursos para poder desarrollar la investigación que se ha llevado a cabo en esta tesis doctoral.

A Pablo e Isabel

El desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral se ha realizado en colaboración bajo convenio entre la empresa TECNOVET S.L. y la Universidad de Murcia, según lo establecido en el apartado 6 de la Disposición final tercera del RD 195/2016, de 13 de mayo, que regula la mención de Doctorado Industrial.

ÍNDICE/INDEX

Índice/Index

1. Resumen/Summary	1
2. Bibliographic review	19
3. Hipótesis/Hypothesis.....	25
4. Objetivos/Objectives	31
5. Articles	37
Article 1: Optimization of post-cervical artificial insemination in gilts: Effect of cervical relaxation procedures and catheter type	39
Article 2: Morphological changes in the porcine cervix: A comparison between nulliparous and multiparous sows with regard to post-cervical artificial insemination.....	43
Article 3: A new device for deep cervical artificial insemination in gilts reduces the number of sperm per dose without impairing final reproductive performance.....	47
6. Discusión general	51
7. Conclusiones/Conclusions	61
8. Abreviaturas/Abbreviations	67
9. Anexo I: Patente.....	71
10. Anexo II: Publicaciones derivadas de la tesis	93

1. Resumen/Summary

Resumen

El crecimiento de la producción porcina ha experimentado un aumento del 35% del censo a nivel mundial en el último siglo (FAOSAT 2017). Este aumento de la producción es debido al aumento de la población mundial en las últimas décadas, y al incremento de la renta per cápita que ha facilitado el acceso al consumo de carne. Los sistemas de los principales países productores de porcino y de algunos de los nuevos países que están encabezando esta industria se encuentran en la necesidad de disponer de mejores técnicas productivas y por tanto más eficientes.

Muchos han sido los avances técnicos de la producción porcina que han evolucionado e incrementado su eficiencia como son la sanidad, alimentación, reproducción, bienestar animal, manejo e instalaciones. El área de reproducción es una parte fundamental en la industria porcina. Su desarrollo en las últimas décadas ha sido fundamental en la evolución del sector, pasando de la monta natural al desarrollo de la inseminación artificial (IA) en el último tercio del pasado siglo. La técnica de IA consiste en la elaboración de dosis seminales de los mejores sementales en instalaciones específicas para ello, denominadas *centros de inseminación artificial*, donde se procesa el semen extraído y se elaboran dosis seminales, para su posterior aplicación en cerdas en las granjas de destino. El desarrollo de la IA ha sido fundamental para mejorar el rendimiento de la producción, debido a que es una herramienta de gran ayuda en la mejora de los resultados reproductivos, así como en la evolución y difusión genética, fundamentado por la reducción del número de espermatozoides necesarios por IA. Esta técnica ha sido continuamente mejorada desde sus inicios, ya que la técnica consistía en la aplicación de una dosis seminal de 80-100 ml y una concentración de $3-4 \times 10^9$ espermatozoides, mediante un catéter que se adapta en el cuello uterino de la cerda, denominándose IA cervical (CAI). A principio de este siglo, la técnica ha sufrido un gran avance, con el desarrollo de la IA post-cervical (PCAI), que consiste en un dispositivo de inseminación formado por el mismo catéter que en CAI, más una cánula insertada en el interior del catéter y que permite la deposición seminal en el cuerpo del útero. Con esta

metodología el volumen necesario para realizar PCAI se reduce, siendo las dosis utilizadas de 40-60 ml, y una concentración de $1-2 \times 10^9$ espermatozoides. Esta reducción del material seminal conlleva el beneficio, por un lado, de poder seleccionar genéticamente aún más los sementales empleados, y por otro lado aumentar la homogenización de la descendencia. Además, el uso de PCAI reduce el tiempo de aplicación en granja. Por todos estos motivos el uso de PCAI conlleva una mayor eficiencia económica comparada con la técnica de CAI.

La población de cerdas presentes en una granja se distribuye desde cerdas jóvenes de reposición hasta cerdas en el final de su ciclo reproductivo eficaz para producción. Desde su inicio, la técnica de PCAI se ha aplicado en cerdas multíparas (cerdas que han tenido dos o más partos; representan el 62-64% del censo) y en cerdas primíparas (cerdas que solo han tenido un parto; representan el 17-18% del censo), pero no así en cerdas nulíparas (cerdas cíclicas jóvenes que aún no han tenido ningún parto; representan el 19-20% del censo), debido a la dificultad de su aplicación en este tipo de hembras de reposición. En el manejo general de la producción porcina, y en concreto en la reproducción, el objetivo sería estandarizar y simplificar los procesos que conlleva la IA. Sin embargo, la limitación del uso de PCAI en cerdas nulíparas, obliga a seguir utilizando el método CAI para estas hembras de reemplazo, así como para el centro de inseminación seguir elaborando dosis de distintos volúmenes y número de espermatozoides.

Por tanto, la necesidad de unificar el método de IA en las diferentes poblaciones de cerdas (nulíparas, primíparas y multíparas) presentes en una granja porcina nos ha derivado a plantearnos el objetivo general de la presente tesis doctoral: evaluar la validez actual de la aplicación del método PCAI en hembras nulíparas y posibles variantes que mejoren su eficiencia, así como el estudio de otras alternativas basadas en las características anatómicas del cuello uterino de este tipo de cerdas. Para la consecución del objetivo general se han planteado diferentes objetivos específicos divididos en 3 artículos científicos.

El principal problema en la aplicación del método de PCAI en cerdas nulíparas, al parecer, radica en la dificultad en atravesar por completo el canal cervical con la cánula interna del dispositivo de IA. Por tanto, en el **artículo 1** hipotetizamos que modificaciones en el canal cervical del útero, así como en la tipología del dispositivo utilizado pueden mejorar el rendimiento de la aplicación de PCAI en esta población de cerdas. El objetivo principal en el artículo 1 fue la valoración actual de la técnica PCAI en cerdas nulíparas, así como el estudio de posibles alternativas para la mejora de su eficiencia. Un primer experimento llevado a cabo consistió en la aplicación en cerdas nulíparas de un catéter utilizado en cerdas múltiparas para PCAI (MpC), formado por un catéter con una morfología en su extremo en multianillas (diámetro de 22 mm) y una cánula interna de 3.5 mm de diámetro, comparándolo con un grupo control de cerdas nulíparas inseminadas con la técnica CAI. Las cerdas nulíparas inseminadas mediante PCAI que no pudieron ser inseminadas con esta técnica, fueron tratadas antes de volver a inseminarlas, por un lado, con la aplicación de un tratamiento farmacológico (Hidrocloruro de Vetrabutina-VC, Monzal[®]) que actúa como espasmolítico sobre las fibras lisas musculares uterinas produciendo relajación del tono de la musculatura uterina, y por otro lado, con un tratamiento térmico a base de diluyente, habitualmente utilizado para la conservación espermática, atemperado a 44.9 ± 2.15 °C (WE). Con el uso del catéter MpC se obtuvo un éxito de aplicación del 23.1%. Aquellas hembras que no pudieron ser inseminadas en este primer intento (76.9%), mostraron un éxito de aplicación del dispositivo de inseminación del 34.2% para el grupo de nulíparas en las que se aplicó el tratamiento VC, y de un 23.8% de éxito en el grupo en el que se aplicó WE, no mostrando diferencias significativas entre ambos tratamientos. Por otro lado, se estudiaron los resultados reproductivos (% de partos, número total de lechones nacidos y lechones nacidos vivos, e índice de fertilidad) en los tres grupos estudiados en este experimento comparándolos con el grupo control (cerdas inseminadas con CAI), no observándose diferencias significativas entre ellos. El experimento 2 consistió en evaluar la eficacia de distintos diseños de dispositivos de PCAI en cerdas nulíparas, comparándolo con el grupo MpC estudiado en el experimento 1, y con el grupo control de cerdas nulíparas inseminadas mediante CAI. El primer diseño de dispositivo utilizado (GpC1) estaba basado en un catéter multianillas de menor diámetro que el utilizado en el grupo

MpC (16 mm), pero con la misma cánula interna. El segundo diseño de dispositivo (GpC2) consistió en el mismo catéter multianillas del grupo GpC1, pero con una cánula de menor diámetro (2.5 mm). Los resultados mostraron que el dispositivo utilizado en el grupo GpC2, permitió un mayor éxito de aplicación que el grupo GpC1 (60.3% vs. 37.0%, $p < 0.05$). En cuanto a los resultados reproductivos no difirieron entre los distintos dispositivos utilizados. Finalmente, se comprobó si la aplicación de una primera inseminación (CAI) podría aumentar la tasa de aplicación en la segunda inseminación PCAI a las 24 horas. Para ello, las hembras nulíparas fueron inseminadas al inicio del estro mediante la técnica de CAI y 24 horas después mediante el uso de los distintos dispositivos de PCAI ya descritos (MpC, GpC1 y GpC2). Los resultados obtenidos no mejoraron el éxito de aplicación de los distintos dispositivos utilizados de PCAI tras una previa IA con el método de CAI.

Como hemos podido comprobar en los experimentos del artículo 1, la principal limitación de la aplicación de la técnica de PCAI radica en la dificultad de la cánula interna de atravesar el cérvix. Es por ello por lo que en el **artículo 2** planteamos estudiar las causas que pueden provocar dicha limitación en cerdas nulíparas, planteando la hipótesis de que el envejecimiento y número de partos modifica el canal cervical, aumentando su elasticidad y por tanto la facilidad de aplicación de PCAI. En un primer estudio, se analizó la morfología macroscópica del tracto genital involucrada en PCAI, incluyendo las partes anatómicas desde la vulva hasta el cuerpo del útero separando 3 partes: 1) pre-uterina (V) compuesta desde la vulva hasta el primer anillo cervical; 2) canal cervical (Cx); y 3) cuerpo del útero (UB) compuesto desde el último anillo cervical hasta los cuernos uterinos. Los resultados mostraron que únicamente el Cx presentó diferencias significativas en cuanto a longitud entre los 2 grupos de cerdas analizadas (nulíparas vs. múltiparas), siendo su longitud mayor en las cerdas múltiparas (25.93 ± 4.64 cm vs. 21.65 ± 3.39 cm, $p < 0.001$). La longitud total media del tracto reproductivo que debe ser atravesada por la cánula en PCAI (obtenida mediante la suma de V y Cx) fue estadísticamente superior también en las cerdas múltiparas (56.23 ± 6.01 cm vs. 50.39 ± 5.25 cm, $p < 0.001$). En un segundo estudio se analizó la morfología y estructura de las partes vaginal (parte caudal, sección del cuello uterino

en contacto con la vagina) y uterina (parte craneal, relacionada con el cuerpo uterino) del cérvix. Los resultados obtenidos mostraron solo diferencias significativas en la parte uterina del cérvix (sección transversal), siendo mayor en cerdas multíparas que en nulíparas (perímetro: 8.50 ± 1.44 vs. 6.28 ± 0.92 cm, $p < 0.001$; área: 4.07 ± 1.46 vs. 2.46 ± 0.56 cm², $p < 0.01$). Para poder profundizar aún más en el estudio del cérvix, y por tanto, en sus limitaciones durante el uso de PCAI, se realizó un estudio histológico de ambas secciones del cérvix (vaginal vs. uterina) comparando ambos tipos de cerdas. En la sección vaginal no se observaron diferencias significativas entre los grupos de cerdas estudiadas respecto al grosor del endometrio y el miometrio. Sin embargo, en la sección uterina, el grosor del miometrio en las cerdas multíparas fue superior que en las hembras nulíparas. En cuanto al contenido tisular (tejido conectivo, fibras musculares y capilares) las cerdas multíparas presentaron un mayor contenido de tejido conectivo que las nulíparas (67.60 ± 13.38 vs. $58.86 \pm 10.78\%$, $p < 0.001$), pero menor contenido de fibras musculares (39.79 ± 10.24 vs. $30.66 \pm 13.69\%$, $p < 0.001$), no observándose diferencias significativas en el contenido de capilares. Analizando por secciones, la sección vaginal presentó mayor contenido de tejido conectivo y menor de fibras musculares que la sección uterina en ambos grupos de cerdas ($p < 0.05$), siendo mayor la diferencia entre ambos grupos en la sección uterina, donde las cerdas nulíparas presentaron menor contenido en tejido conectivo y mayor en fibras musculares ($p < 0.001$). Como último estudio de este artículo se analizó la morfología interna del canal cervical. Para ello, se inyectó silicona en aparatos reproductores *ex vivo* con la ayuda de catéteres de inseminación. Observando los moldes obtenidos, se comprobó que la forma del canal cervical presentaba una forma ondulada en su plano vertical, a diferencia de la forma de sacacorchos que se creía tener. Estudiando morfológicamente los moldes cervicales obtenidos, se pudo apreciar una diferencia en el patrón ondulado de las crestas cervicales entre la parte caudal de la craneal, quedando claramente diferenciadas entre sí en ambos grupos de cerdas. Sin embargo, a diferencia de la sección caudal donde no existen diferencias significativas entre los grupos de cerdas estudiados, en la sección craneal si se observaron, donde los resultados mostraron valores inferiores de los parámetros analizados en cerdas nulíparas frente a cerdas multíparas. Estas diferencias se han observado en el grosor de la luz cervical (0.40 ± 0.01 vs. 0.56

± 0.05 cm, $p < 0.01$), la distancia entre dos crestas consecutivas (0.72 ± 0.13 vs. 1.26 ± 0.04 cm, $p < 0.001$), y el área entre las crestas (0.55 ± 0.04 vs. 0.72 ± 0.07 cm², $p < 0.05$). Si embargo, no se han encontrado diferencias significativas en la altura de las crestas cervicales. Otro parámetro estudiado ha sido la densidad del número de crestas cada 10 cm, siendo significativamente mayor en la parte uterina de las cerdas nulíparas (11.41 ± 2.72 vs. 8.51 ± 2.02 , $p < 0.01$).

Una vez caracterizado el cuello uterino de la cerda nulípara, podemos concluir que existen diferencias anatómicas evidentes entre ambos grupos de cerdas. Las características morfológicas estudiadas de la sección uterina del cérvix en nulíparas muestran las limitaciones anatómicas que pueden justificar la dificultad para atravesar el canal cervical hasta el cuerpo del útero mediante un dispositivo PCAI, tal como se estudió en el artículo 1. Estas conclusiones nos llevan a desarrollar el **artículo 3**, donde la hipótesis de partida se basa en que el diseño de un nuevo dispositivo de IA profunda basado en las características anatómicas específicas de las cerdas nulíparas nos permitiría aumentar la eficiencia de la IA en este tipo de cerdas reduciendo el volumen y concentración de las dosis seminales sin menoscabar en la eficiencia reproductiva. Por tanto, el objetivo ha sido el diseño y funcionalidad de un nuevo dispositivo de IA denominado *Inseminación Artificial Profunda-Cervical* (Dp-CAI) (Nº patente ES 2 600 378 A1), en base a los resultados obtenidos en el artículo 2, diseñado específicamente para su uso en cerdas nulíparas. Este nuevo dispositivo de inseminación está compuesto por dos elementos principales. Por un lado, un catéter cervical tipo multianillas, con un diámetro de 17 mm en su extremo, y una longitud de 52 cm. Dentro de este catéter va insertada una cánula flexible con un diámetro de 3 mm, y una longitud de 65 cm. Su diferencia más significativa frente al dispositivo utilizado en PCAI de múltiparas, es la longitud de la cánula interna, por lo que la penetración total de la cánula desde la salida craneal del catéter es de 8 cm, en comparación con los 16 cm de la cánula del dispositivo de múltiparas, además de la disminución en el diámetro de catéter y cánula. El primer objetivo en este artículo fue evaluar el porcentaje de éxito obtenido durante la aplicación de Dp-CAI, considerando la inseminación como exitosa cuando se conseguía introducir totalmente la cánula interna sin observar dificultad ni reflujo seminal en el momento de la inseminación. Además de

considerar el éxito en la introducción de la cánula, se relacionó el éxito en la inseminación Dp-CAI con otros factores, como la longitud del dispositivo que distaba fuera de la cerda, y por otro lado, el número de estros previos a la primera inseminación (1 vs. 2 estros). Los resultados mostraron un porcentaje de éxito del 88.9% con el nuevo dispositivo Dp-CAI, disminuyendo el éxito de la técnica a medida que aumentaba la longitud de dispositivo utilizado que permanecía fuera de la cerda durante el proceso de inseminación. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el éxito de la técnica entre el número de estros previos a la primera inseminación, aunque sí una tendencia favorable a aumentar el éxito de introducción de la cánula en las cerdas con 2-estros previos (1-estro 84.3% vs. 2-oestrus 89.4%, $p = 0.068$). Sin embargo, sí afectó significativamente el número de estros a la longitud del dispositivo fuera de la cerda, siendo menor en el grupo de 2-estros frente al grupo de 1-estro (27.15 ± 3.7 vs. 27.96 ± 3.9 cm, $p < 0.05$). El segundo objetivo de este artículo fue evaluar los resultados reproductivos entre los dos grupos experimentales: 1) Grupo Dp-CAI: cerdas nulíparas inseminadas con el nuevo dispositivo utilizando una dosis seminal de 1.5×10^9 espermatozoides/45 ml; 2) Grupo CAI (control): cerdas nulíparas inseminadas con el dispositivo cervical utilizando una dosis seminal de 2.5×10^9 espermatozoides/85 ml. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre las dos metodologías de inseminación, siendo el rendimiento reproductivo alcanzado similar entre ambos métodos, lo que indica que la nueva técnica de inseminación Dp-CAI, a pesar de utilizar 1×10^9 espermatozoides menos por cada inseminación, logra obtener resultados productivos similares. En cuanto a los resultados reproductivos obtenidos en función de la longitud exterior del dispositivo en la cerda, se observó una menor prolificidad en las cerdas que mostraron durante el proceso de inseminación una mayor distancia del dispositivo fuera de la cerda (> 34 cm), pero sin embargo no se observaron diferencias en la tasa de partos entre las distintas distancias obtenidas.

En conclusión, la aplicación del dispositivo PCAI de cerdas múltiparas no es un mecanismo eficaz para su aplicación en cerdas nulíparas, a pesar de encontrar métodos alternativos que mejoran su eficiencia como el uso de determinados tratamientos o el diseño de

nuevos dispositivos de PCAI. Esta baja eficiencia se debe principalmente a la dificultad en atravesar la parte craneal del cérvix (sección uterina) en cerdas nulíparas debido a que la edad y el número de partos de las cerdas afectan al desarrollo de esta sección, incrementado por tanto la capacidad de ser atravesado por una cánula de PCAI en cerdas múltiparas. Finalmente, el diseño de nuevos dispositivos de inseminación como Dp-CAI, basado en estudios anatómicos, permite aumentar la eficacia de aplicación de la inseminación profunda en cerdas nulíparas obteniendo, con una menor cantidad de espermatozoides en cada inseminación, resultados reproductivos similares a los obtenidos con el método habitual de inseminación CAI.

Summary

Pig production has seen a 35% worldwide increase since 2000 (FAOSAT 2017) due to the increase in population and in per capita income, which has meant wider access to meat consumption. However, the production systems of long-standing pig-producing countries and of some of the newer ones, too, need better and more efficient production techniques.

There have been many technical advances in pig production that have increased efficiency, such as improvements in feeding, reproduction, animal welfare, handling and facilities, among others. Breeding area is a fundamental part of the pig industry, and development of the same during recent decades has been fundamental in the sector's evolution, which has gone from depending on natural mating to the widespread use of artificial insemination (AI) in the last third of the last century. The AI technique consists of preparing seminal doses of the best boars in facilities designed for this purpose, called boar studs. This is where the extracted semen is processed, and seminal doses are prepared for subsequent application in sows on the target farms. The development of AI has been fundamental for improving production performance, since it not only improves reproductive results, but has contributed to genetic evolution and diffusion, based on a reduction in the number of sperm needed. The AI method has been continuously improved since its inception, when the technique consisted of applying a seminal dose of 80-100 ml at a concentration of $3-4 \times 10^9$ sperm, using a catheter adapted to the cervix of the sow, and known as cervical artificial insemination (CAI). At the beginning of this century, the technique underwent a great advance, with the development of post-cervical artificial insemination (PCAI), which uses an insemination device formed by the same catheter as in CAI, plus a cannula inserted inside the catheter that allows the seminal deposition area to be extended to the body of the uterus. With this methodology, the volume of sperm necessary to perform PCAI is reduced to 40-60 ml and a concentration of $1-2 \times 10^9$ sperm. This reduction in seminal material has the benefit of enabling the number of genetically selected boars to be further reduced, and consequently increasing

homogenization of the offspring. PCAI also reduces the time needed for application on the farm. The overall result of using PCAI is greater economic efficiency compared to the use of CAI.

The sow population on a farm ranges from replacement gilts to sows at the end of their effective reproductive cycle. Since its inception, PCAI has been applied in multiparous sows (sows that have had two or more farrowings, and which represent 62-64% of the female census) and in primiparous sows (sows that have only had one farrowing, representing 17-18% of the census), but not in nulliparous females (young cyclic gilts that have not yet had any parturition, and which make up the remaining 19-20% of the census), due to the difficulty involved in its application in this type of replacement female. In the general management of pig production, especially reproduction, the objective would be to standardize and simplify the processes used. However, the limitations of PCAI for use with gilts means that the CAI method continues to be for these replacement females, and that boar studs must provide doses consisting of different volumes and numbers of sperm.

It was the need to unify the AI methods used in the different populations of sows (nulliparous, primiparous and multiparous) normally found on pig farms that led us to consider the general objective of this doctoral thesis: to assess the current validity of the application of PCAI in nulliparous females and possible variants that may improve its efficiency, as well as to study alternatives based on the anatomical characteristics of the cervix of this type of animal. For this, several specific objectives are proposed, which forms the basis of three scientific articles.

The main problem in applying PCAI in nulliparous females seems to lie in the difficulty of completely crossing the cervical canal with the internal cannula of the AI device. Therefore, in **article 1** modifications in the cervical canal of the uterus, as well as the type of device used, may improve the performance of the technique in this female population. The main objective in the article was to assess the use of PCAI in nulliparous females, as well as to study possible alternatives to improve its efficiency. A first experiment involved using a catheter ending in

multiple rings (22 mm diameter) and with an internal cannula of 3.5 mm diameter in multiparous sows for PCAI (MpC) and comparing the results with a control group of nulliparous females inseminated using the CAI technique. Nulliparous animals that could not be inseminated with PCAI technique were treated before re-inseminating them by means of a pharmacological treatment (Vetrabutin Chlorhydrate-VC, Monzal®) that acts as a spasmolytic on the fibres of the smooth uterine muscle, relaxing the uterine musculature, and extender treatment used for sperm preservation tempered to 44.9 ± 2.15 °C (WE). Using the MpC catheter, a success rate of 23.1% was obtained. Nulliparous females that could not be inseminated at the first attempt (76.9%) had an insemination success rate of 34.2% when VC treatment, was applied, and 23.8% success when WE was used, the differences between the two treatments not being statistically significant. Neither were there significant differences between the reproductive results (% of farrowings, total number of piglets born and live-born piglets, and fertility index) for the three groups studied and the results obtained with the control group (gilts inseminated with CAI). Experiment 2 consisted of evaluating the efficacy of different designs of the PCAI device in nulliparous females and comparing the results with those obtained for the MpC group studied in experiment 1 and with the control group of nulliparous females inseminated by CAI. The first design used (GpC1) was based on a smaller diameter (16 mm) multi-ring catheter than that used in the MpC group, but with the same inner cannula. The second device design (GpC2) consisted of the same multi-ring catheter as used in the GpC1 group, but with a smaller diameter (2.5 mm) cannula. The results showed that the device used with the GpC2 group provided greater application rate than the GpC1 group (60.3% vs. 37.0%, $p < 0.05$). As for the reproductive results, they did not differ between the different devices used. Finally, it was checked whether a first insemination by CAI could increase the application rate in the second PCAI insemination after 24 hours. To do this, nulliparous females were inseminated at the start of oestrus using the CAI technique and 24 hours later using the different PCAI devices described above (MpC, GpC1 and GpC2). The results showed that impro application success of the different devices PCAI used did not improve after insemination using the CAI method.

The experiments described in article 1 demonstrated that the main limitation of the PCAI technique lies in the difficulty of the inner cannula crossing the cervix. This is why in **article 2** we proposed to study the causes of this limitation in nulliparous females, based on the hypothesis that ageing and the number of parturitions modifies the cervical canal, increasing its elasticity and therefore the ease with which PCAI devices can be applied. In a first study, the macroscopic morphology of the genital part involved in PCAI was analysed, including the anatomical parts between the vulva and main body of the uterus, considering them as three parts: i) pre-uterine (V) between the vulva and the first cervical ring; ii) cervical canal (Cx); and iii) body of the uterus (UB) between the last cervical ring and the uterine horns. The results showed that only the Cx differed significantly in length between the two groups of nulliparous and multiparous sows, being longer in multiparous sows (25.93 ± 4.64 cm vs. 21.65 ± 3.39 cm, $p < 0.001$). The mean total length of the reproductive tract that must be crossed by the cannula in PCAI (obtained by adding V and Cx) was also statistically greater in multiparous sows (56.23 ± 6.01 cm vs. 50.39 ± 5.25 cm, $p < 0.001$). In a second study, the morphology and structure of the vaginal (caudal part, section of the cervix in contact with the vagina) and uterine (cranial part, related to the uterine body) of the cervix were analysed. The results obtained only pointed to significant differences in the uterine section, which was longer in multiparous than in nulliparous females (perimeter: 8.50 ± 1.44 vs. 6.28 ± 0.92 cm, $p < 0.001$; area: 4.07 ± 1.46 vs. 2.46 ± 0.56 cm², $p < 0.01$). To further study the cervix and therefore its limitations in PCAI, a histological study of both sections of the cervix (vaginal and uterine) was performed in both types of sow. No significant differences in the vagina section were observed between the two groups regarding the thickness of the endometrium and the myometrium. However, in the uterine section, the thickness of the myometrium of the multiparous sows was greater than that of their nulliparous counterparts. In terms of tissue content (connective tissue, muscle fibres and capillaries), multiparous sows had more connective tissue than nulliparous animals (67.60 ± 13.38 vs. $58.86 \pm 10.78\%$, $p < 0.001$), but lower content of muscle fibres (39.79 ± 10.24 vs. $30.66 \pm 13.69\%$, $p < 0.001$), but there were no significant differences in the content of capillaries. Analysed by sections, the vaginal section presented a higher content of connective tissue and less smooth muscle fibres than the uterine section in both

groups of sows ($p < 0.05$), the difference between both groups being greater in the uterine section, where nulliparous females had less content in connective tissue and greater in muscle fibres ($p < 0.001$). Lastly, in article 2, the internal morphology of the cervical canal was analysed by injecting silicone into reproductive *ex vivo* genital tracts using the insemination catheters. The casts obtained in this way pointed to the wavy shape of the cervical canal in its vertical plane, which differed from the corkscrew shape it was believed to have. Morphologically, the cervical casts clearly identified differences in the wavy pattern of the cervical crests between the caudal and the cranial parts in both groups of animals. However, unlike in the caudal section, where no significant differences between groups were evident, the analysed parameters showed lower values in the cranial part of nulliparous than in multiparous sows. These differences concerned the thickness of the cervical crest (0.40 ± 0.01 vs. 0.56 ± 0.05 cm, $p < 0.01$), the distance between two consecutive ridges (0.72 ± 0.13 vs. 1.26 ± 0.04 cm, $p < 0.001$), and the area between the ridges (0.55 ± 0.04 vs. 0.72 ± 0.07 cm², $p < 0.05$). However, no significant differences in the height of the cervical ridges were observed. Another parameter studied was the density of the number of ridges every 10 cm, which was significantly greater in the uterine part of nulliparous females (11.41 ± 2.72 vs. 8.51 ± 2.02 , $p < 0.01$).

Characterisation of the cervix of nulliparous females pointed to clear anatomical differences between both groups of sows. The morphological characteristics of the uterine section of the cervix studied in nulliparous animals identified the anatomical limitations that may explain the difficulty involved in crossing the cervical canal to reach the body of the uterus with the PCAI device, as studied in article 1. These conclusions led to **article 3**, in which we studied the design of a new deep AI device based on the specific anatomical characteristics of nulliparous animals, which we hoped might increase the efficiency of AI by reducing the volume and concentration of the seminal doses needed without affecting reproductive efficiency. The design and functionality of this new AI device for use in what we called Deep-Cervical Artificial Insemination (Dp-CAI) (Patent No. ES 2 600 378 A1) were based on the results obtained in article 2, and specifically intended for use in gilts. This new insemination device is made up of two main elements: a multi-

ring cervical catheter (17 mm diameter at its end, and 52 cm long), into which a flexible cannula (3 mm in diameter and 65 cm in length) is inserted. The most significant difference compared with the device used in the PCAI of multiparous is the length of the inner cannula, which means that the total penetration distance of the cannula from the cranial outlet of the catheter is 8 cm, compared with the 16 cm reached by the cannula of the multiparous device, while another advantage is the decrease in catheter and cannula diameter. The first objective in this article was to evaluate the percentage of success obtained during the application of Dp-CAI, considering insemination as successful when it was possible to fully introduce the inner cannula with no difficulty and without observing seminal reflux at the time of insemination. In addition to considering the success in the introduction of the cannula, success in the Dp-CAI insemination was related to other factors, such as the length of the device that remained outside the gilts, and the number of oestrus before the first insemination (1 vs. 2 oestrus). The results pointed to a success rate of 88.9% with the new Dp-CAI device, the success of the technique decreasing as the length of the device remaining outside the gilt increased. On the other hand, no significant differences were observed in the success of the technique between the number of oestrus before the first insemination, although there was a favourable trend for success to increase in gilts that had had a previous two oestruses (1-oestrus 84.3% vs. 2-oestrus 89.4%, $p = 0.068$). However, while the number of oestrus significantly affected the length of the device remaining outside the gilt, it was less in the 2-oestrus group compared with the 1-oestrus group (27.15 ± 3.7 vs. 27.96 ± 3.9 cm, $p < 0.05$). The second objective of this article was to compare the reproductive results of the two experimental groups: i) Dp-CAI group: nulliparous females inseminated with the new device using a seminal dose of 1.5×10^9 sperm/45 ml; ii) CAI group (control): nulliparous females inseminated with the cervical device using a seminal dose of 2.5×10^9 sperm/85 ml. The results pointed to no significant differences between the two insemination methods, the reproductive performance achieved being similar for both methods, which indicates that the new Dp-CAI insemination technique, despite using 1×10^9 fewer sperm for each insemination, provides similar productive results. Regarding the reproductive results obtained as a function of the external length of the device outside the gilt, the lowest results in terms of prolificity were found in the gilts in

which a greater length of the device remained outside the female (> 34 cm), but nevertheless, no differences were observed in the farrowing rate between the different distances obtained.

In conclusion, the application of the PCAI device in multiparous sows is not an effective mechanism for nulliparous females, despite the alternative methods that can be used to improve its efficiency, such as using certain pharmacological and physical treatments or novel designs new for the PCAI devices. This low efficiency is mainly due to the difficulty in crossing the cranial part of the cervix (uterine section) in nulliparous females because the age and number of parturitions of the sows affect the development of this section, thereby increasing the ability to be pierced by the PCAI cannula used in multiparous sows. Finally, the design of new insemination devices for Dp-CAI, based on anatomical studies, increases the application efficiency of the deep insemination process in gilts, providing reproductive results similar to those using the CAI insemination method but with a lower number of sperm in each insemination.

2. Bibliographic review

Bibliographic review

Review: Post-cervical artificial insemination: the technique that came to stay

Theriogenology. 2019 Apr 15;129:37-45. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.02.004.



Post-cervical artificial insemination in porcine: The technique that came to stay

F.A. García-Vázquez ^{a, b, *}, A.P.G. Mellagi ^c, R.R. Ulguim ^c, I. Hernández-Caravaca ^a,
P.J. Llamas-López ^a, F.P. Bortolozzo ^{c, **}

^a Department of Physiology, Veterinary School, International Excellence Campus for Higher Education and Research (Campus Mare Nostrum), University of Murcia, Murcia, Spain

^b Institute for Biomedical Research of Murcia, IMIB-Arrixaca, Murcia, Spain

^c Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2018

Received in revised form

31 January 2019

Accepted 2 February 2019

Available online 8 February 2019

Keywords:

Fixed-time AI

Intrauterine

Pig

Reproductive technology

Swine

ABSTRACT

The porcine industry is of great importance worldwide, and so any technological innovation in one or more of the associated production areas is of interest for meat production. Among such innovations in the reproduction area, post-cervical or intrauterine artificial insemination (PCAI) has emerged as a new approach in artificial insemination (AI). PCAI is gradually replacing traditional cervical insemination (CAI), particularly in countries with intensive pig production industries. This type of insemination, which deposits the semen in the body of the uterus (as opposed to traditional cervical deposition), is increasingly used in the field due to its simplicity and the numerous advantages that it provides at production level (e.g. reduced number of sperm, less time required to perform insemination and faster genetic improvement) and, consequently, from an economic point of view. In addition, since its inception, PCAI has been combined with other reproductive biotechnologies, such as the use of frozen-thawed sperm, fixed-time AI or sperm-mediated gene transfer. However, despite its wide acceptance and application, new approaches for increasing the efficiency of PCAI are constantly being sought, such as the adjustment and standardization in sperm numbers, the conservation of the PCAI semen dose, its association with other biotechnologies (sex-sorted sperm) or its efficacy in young (nulliparous and primiparous) females.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author. Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, Spain.

** Corresponding author.

E-mail addresses: fagarcia@um.es (F.A. García-Vázquez), fpbortol@ufrgs.br (F.P. Bortolozzo).

3. Hipótesis/Hypothesis

Hipótesis

La hipótesis general de esta tesis se basa en que la cerda nulípara, dado que nunca ha tenido ningún parto, tiene un aparato reproductor diferente a la cerda con uno o más partos (primípara o múltipara), y, por tanto, esta diferencia va a influir en el éxito de la aplicación de la inseminación post-cervical, técnica ampliamente utilizada en la mayoría de las granjas porcinas sobre las cerdas de más de un parto. Para ello se diseña el artículo 1, donde la hipótesis es que el uso de la inseminación post-cervical aplicado en cerdas nulíparas va a permitir obtener una reducida tasa de éxito en su aplicación, la cual podría mejorar con la aplicación de varios tratamientos que ayuden a relajar el canal cervical o el rediseño de los catéteres actuales de inseminación post-cervical, facilitando de este modo la aplicación de esta técnica. Tras verificar la hipótesis de partida en el artículo 1, donde hay una mejora del rendimiento de la inseminación post-cervical pero no suficiente a nivel productivo, en el artículo 2 se plantea la hipótesis de que el canal cervical en la cerda nulípara se encuentra menos desarrollado y está constituido por una estructura tanto anatómica como histológica, diferente a la cerda múltipara debido principalmente a la diferencia de edad y número de partos entre ambos tipos de cerdas. Con los resultados obtenidos en el artículo 2, donde hemos verificado la hipótesis de partida, se plantea el artículo 3, cuya hipótesis se basa en el diseño de un dispositivo de inseminación intra-cervical profunda, adaptado al aparato reproductor de la cerda nulípara según los estudios previos, que permita reducir el número de espermatozoides utilizados por dosis seminal, pero manteniendo un éxito de aplicación y resultados reproductivos similares a una inseminación cervical convencional.

Hypothesis

The general hypothesis of this thesis is based on the fact that the reproductive system of nulliparous females differs from that of sows that have had one or more farrowings (primiparous or multiparous). Such differences, it was thought, would influence the success of post-cervical insemination, a technique widely used on most pig farms in sows with more than one farrowing. The hypothesis of article 1 was that the low success rate of post-cervical insemination in nulliparous females could be improved through the application of treatments that help to relax the cervical canal or by a redesign of the catheters commonly used for post-cervical insemination, making them easier to apply in gilts. After verifying the initial hypothesis of article 1 that the performance of post-cervical insemination could be improved, although not sufficiently at the productive level to make it viable, the hypothesis put forward in article 2 was that the cervical canal of nulliparous females is less developed and anatomically and histologically different from that of multiparous sows, mainly due to the difference in age and number of parities between them. Based on the results obtained in article 2, the hypothesis of article 3 that a design of the deep intracervical insemination device, adapting it to the reproductive apparatus of nulliparous gilts, would allow the quantity of sperm used per seminal dose to be reduced, while permitting successful application and reproductive results similar to those reached by conventional cervical insemination.

4. Objetivos/Objectives

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis fue determinar el rendimiento de la inseminación artificial post-cervical en hembras nulíparas y evaluar diferentes alternativas para una deposición profunda de espermatozoides basadas en las características anatómicas del cuello uterino en este tipo de hembras. Para alcanzar el objetivo principal se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- **Objetivo 1:**

Evaluar la implementación y eficacia de la inseminación artificial post-cervical en hembras nulíparas: i) mediante el catéter habitualmente usado en cerdas multíparas; ii) a través del catéter post-cervical de multíparas en combinación con diferentes tratamientos (hidrocloruro de vetrabutrina o diluyente caliente) que inducen una relajación cervical; iii) mediante el uso de nuevos dispositivos de inseminación artificial post-cervical diseñados exclusivamente para cerdas nulíparas (reduciendo el diámetro del extremo multianillas del catéter y/o de la cánula interna) **(Artículo 1)**.

- **Objetivo 2:**

Comparar la morfología y la estructura del cuello uterino en dos grupos de cerdas (nulíparas vs. multíparas) con diferentes antecedentes fisiológicos de paridad y edad: i) la morfología macroscópica de la parte del tracto genital femenino de interés para la inseminación artificial post-cervical; ii) la morfología y la estructura de ambas partes del cuello uterino (partes vaginal y uterina); iii) la morfología interna del canal cervical **(Artículo 2)**.

- **Objetivo 3:**

Evaluar el rendimiento reproductivo de un nuevo dispositivo de inseminación artificial diseñado específicamente para cerdas nulíparas teniendo en cuenta sus limitaciones anatómicas,

mediante el cual la dosis seminal (utilizando un menor número de espermatozoides que en la inseminación cervical convencional) se deposita profundamente en el cuello uterino (**Artículo 3**).

Objectives

The main objective of the present thesis was to determine the output of post-cervical artificial insemination in nulliparous females (gilts) and to evaluate different alternatives for a to achieve deep spermatozoa deposition based on the anatomical characteristics of the cervix in gilts. For this, the following specific objectives were established:

- **Objective 1:**

To evaluate the implementation and efficacy of post-cervical artificial insemination in gilts by using: i) the commonly used multiparous catheter; ii) a multiparous post-cervical insemination catheter in combination with different treatments (vetrabutrine chlorhydrate or warm extender) that induce cervical relaxation; iii) a new post-cervical artificial insemination devices exclusively designed for gilts (reducing the diameter of the multi-ring tip catheter and/or inner cannula) (**Article 1**).

- **Objective 2:**

To compare the morphology and structure of the cervix in two groups of females (nulliparous and multiparous) with different physiological backgrounds in terms of parities and age, by studying: i) the gross morphology of the part of the female genital tract that its of interest for post-cervical artificial insemination; ii) the morphology and structure of the vaginal and uterine parts of the cervix; iii) the inner morphology of the cervical canal (**Article 2**).

- **Objective 3:**

To evaluate the reproductive performance of a new artificial insemination device specifically designed for gilts, bearing in mind their anatomical limitations, and using a seminal dose (consisting of a lower number of spermatozoa than is commonly used for cervical deposition) deposited deeply in the cervix (**Article 3**).

5. Articles

Articles

Article 1: Optimization of post-cervical artificial insemination in gilts: Effect of cervical relaxation procedures and catheter type

Theriogenology 90 (2017) 147-152. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.027



Optimization of post-cervical artificial insemination in gilts: Effect of cervical relaxation procedures and catheter type



Iván Hernández-Caravaca^{a, b}, Pedro J. Llamas-López^a, M. José Izquierdo-Rico^{c, d, e},
Cristina Soriano-Úbeda^{a, d, e}, Carmen Matás^{a, d, e}, Juan C. Gardón^f,
Francisco A. García-Vázquez^{a, d, e, *}

^a Department of Physiology, Faculty of Veterinary Science, University of Murcia, Murcia, Spain

^b Boehringer-Ingelheim, Spain

^c Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain

^d International Excellence Campus for Higher Education and Research (Campus Mare Nostrum), Spain

^e Institute for Biomedical Research of Murcia (IMIB-Arrixaca), Murcia, Spain

^f Universidad Católica de Valencia, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2016

Received in revised form

22 November 2016

Accepted 26 November 2016

Available online 28 November 2016

Keywords:

Swine

Sperm

Intrauterine

Nulliparous

Insemination catheter

ABSTRACT

Post-cervical (pC) artificial insemination (AI) has been successfully developed for application in multiparous sows, although it has proved problematic in gilts. This study analyzes the use of pC-AI in gilts by two experiments. In the first experiment, the efficiency of pC-AI in gilts was evaluated using a multi-ring multiparous catheter (MpC), which led to 23.1% of the gilts being successfully inseminated. In gilts where insemination was not possible using an MpC, two alternatives were applied before a second attempt at insemination: 1) Vetrabutín Chlorhydrate (VC) was intramuscularly injected in order to relax the cervix; or 2) Warm extender (WE) was deposited in the cervix to modify the cervical muscle dynamics. After the application of these treatments, the success rates achieved with the MpC were 34.2% and 23.8% for VC and WE, respectively. No statistically significant differences were found in the reproductive parameters measured [farrowing (%), litter size and fecundity index] between the use of MpC, or the MpC combined with VC or WE, compared with gilts inseminated by cervical AI (control group). In the second experiment, new catheters based on the anatomical characteristics of gilts (GpC) were used, and the rate of successful pC-AI application were compared (experiment 2a): a) MpC: control; b) GpC1: multi-ring catheter of Ø 16 mm and inner cannula of Ø 3.5 mm; c) GpC2: a multi-ring catheter of Ø with an inner cannula of Ø 2.5 mm. The highest rate of successful cannula penetration was reached in the GpC2 group (60.3%) followed by GpC1 (37.0%) and MpC (19.6%) ($p < 0.05$). There were no differences in the above mentioned reproductive parameters using the three catheters compared with cervical AI method (control group). Moreover, prior cervical AI did not improve subsequent pC-AI application 24 h later (experiment 2b). In conclusion, Vetrabutín Chlorhydrate, warm extender or the new catheters can be considered as useful tools for improving the success rate of pC-AI technique in gilts.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author. Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30071 Murcia, Spain.

E-mail address: fagarcia@um.es (F.A. García-Vázquez).

Articles

**Article 2: Morphological changes in the porcine cervix: A comparison
between nulliparous and multiparous sows with regard to post-cervical
artificial insemination**

Theriogenology 127 (2019) 120-129. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.004



Morphological changes in the porcine cervix: A comparison between nulliparous and multiparous sows with regard to post-cervical artificial insemination

F.A. García-Vázquez^{a, b, *}, P.J. Llamas-López^a, M.A. Jacome^a, L. Sarrias-Gil^c,
O. López Albors^{c, **}

^a Department of Physiology, Faculty of Veterinary Science, University of Murcia, International Excellence Campus for Higher Education and Research, Campus Mare Nostrum, Murcia, Spain

^b Institute for Biomedical Research of Murcia, 30100, Murcia, Spain

^c Department of Anatomy and Comparative Pathology, University of Murcia, International Excellence Campus for Higher Education and Research, Campus Mare Nostrum, 30100, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2018

Received in revised form

23 December 2018

Accepted 9 January 2019

Available online 10 January 2019

Keywords:

Assisted reproductive technology

Collagen

Endometrium

Morphometry

Myometrium

Uterus

ABSTRACT

In recent decades, new artificial insemination (AI) methods, such as post-cervical AI (PCAI), have been developed in pig. PCAI involves crossing the cervix to deposit the sperm in the uterine body. Although PCAI application in sows is frequent, its application in nulliparous (gilts) females it is still limited due to the difficulty of passing through the cranial part of the cervical lumen. We hypothesized that ageing and parity would modify the cervical canal, facilitating the introduction of AI devices through the cervix. The aim was to compare the morphology of the uterus at different levels between multiparous and nulliparous females. Morphological analysis of the uterus pointed to a longer cervix (25.9 ± 4.6 vs. 21.6 ± 3.3 cm, $p < 0.001$) and greater length of the part of the reproductive tract involved in PCAI (from *rima vulvae* to the last cervical cushion) (56.2 ± 6.0 vs. 50.3 ± 5.2 cm, $p < 0.001$) in multiparous sows compared with nulliparous animals. As regards the structure of the vaginal and uterine parts of the cervix (the part in contact with the vagina and uterine body, respectively), the cross-sectional area, perimeter and total thickness were greater in the uterine part of multiparous than of nulliparous animals (area: 4.07 ± 1.46 vs. 2.46 ± 0.56 cm², $p < 0.01$; perimeter: 8.50 ± 1.44 cm vs. 6.28 ± 0.92 cm, $p < 0.001$; thickness: 10.79 ± 0.96 vs. 8.35 ± 0.62 mm, $p < 0.05$), but not in the vaginal part. The tissue content analysed in histological cross-sections also showed differences between female groups, a greater content of connective tissue (58.86 ± 10.78 vs. $67.60 \pm 13.38\%$, $p < 0.001$) and a lower amount of muscle fibres (39.79 ± 10.24 vs. $30.66 \pm 13.69\%$, $p < 0.001$) being observed in multiparous sows. Finally, silicone casts of the cervical lumen revealed differences between the two groups in the size and shape of the ridges in the lumen trajectory. Parity, which is also influenced by ageing, determines important changes in the size, structure and tissue content of the cervix wall, as well as in the morphology of the cervical canal, which may be responsible for the different levels of performance of PCAI in the female populations. Therefore, the future design of AI strategies and catheters should take into consideration the morphological variations of the cervix lumen, which will depend on age and parity of the females.

© 2019 Published by Elsevier Inc.

* Corresponding author. Department of Physiology, Faculty of Veterinary, University of Murcia, Campus de Espinardo, Murcia, 30100, Spain.

** Corresponding author. Department of Anatomy and Comparative Pathology, Faculty of Veterinary, University of Murcia, Campus de Espinardo, Murcia, 30100, Spain.

E-mail addresses: fagarcia@um.es (F.A. García-Vázquez), albors@um.es (O. López Albors).

Articles

Article 3: A new device for deep cervical artificial insemination in gilts reduces the number of sperm per dose without impairing final reproductive performance

Journal of Animal Science and Biotechnology (2019) 10:11. doi.org/10.1186/s40104-019-0313-1

RESEARCH

Open Access



A new device for deep cervical artificial insemination in gilts reduces the number of sperm per dose without impairing final reproductive performance

Pedro J. Llamas-López¹, Rebeca López-Úbeda^{2,3}, Gustavo López⁴, Emily Antinoja⁴ and Francisco A. García-Vázquez^{1,3*} 

Abstract

Background: The aim of this study was to evaluate the reproductive performance of a new artificial insemination (AI) device specifically designed for gilts (Deep cervical AI, Dp-CAI) by means of which the sperm is deposited deeply in the cervix (8 cm more cranial than in traditional cervical insemination-CAI). New AI techniques have arisen in recent decades in the porcine industry, such as post-cervical artificial insemination (PCAI), which involves depositing the sperm in the body of the uterus [through a catheter (outer tube)-cannula (inner tube)] rather than by CAI. Although the PCAI method has been successfully applied in farm conditions to reduce sperm doses without impairing the reproductive performance, this technique has limitations in gilts mainly because of the difficulty involved in introducing the inner cannula through the cranial part of the cervix. For this reason, the Dp-CAI method described herein may be considered as an alternative to CAI and PCAI methods in gilts.

Results: Gilts were divided in two experimental groups: 1) Dp-CAI: gilts ($n = 1166$) inseminated using 1.5×10^9 sperm/45 mL; 2) CAI (as a control group): gilts ($n = 130$) inseminated using 2.5×10^9 sperm/85 mL. The Dp-CAI method was successfully applied in 88.90% of the gilts, with no differences detected between gilts with 1 or 2 previous oestrus cycles, although the catheter could be introduced more deeply in 2 oestrus gilts ($P < 0.05$). As the length of the insemination device that could not be introduced increased (at the moment of insemination), so the success rate of the Dp-CAI device fell, as did the total number of piglets born. When the reproductive output in CAI and Dp-CAI was compared, none of the parameters analysed [pregnancy and farrowing rates (%), and number of piglets born (total and live)] showed significant differences.

Conclusions: The use of the Dp-CAI technique provides a new AI method as an alternative to CAI and PCAI for pigs. The device, especially designed for gilts, was used with a high degree of success reducing conventional sperm doses without impairing reproductive parameters.

Keywords: Cervix, Intrauterine, Nulliparous, Porcine, Post-cervical insemination

* Correspondence: fagarcia@um.es

¹Department of Physiology, Faculty of Veterinary, Campus Mare Nostrum, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain

³Institute for Biomedical Research of Murcia (IMIB-Arrixaca), Murcia, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

6. Discusión general

Discusión general

La importancia de la industria porcina es evidente ya que supone un alto porcentaje del consumo de carne, representando un 36% en Europa, y un 28% a nivel mundial del consumo de origen animal [1]. El avance en la producción porcina es continuo con el objetivo de maximizar la eficiencia en este sector. Los avances llevados a cabo en esta industria en las últimas décadas han estado dirigidos a diferentes áreas como genética, nutrición o reproducción entre otros [2]. En el ámbito reproductivo, el desarrollo de la IA porcina es uno de estos avances que han estado en continua evolución, siendo fundamental para mejorar el rendimiento de la producción. Desde la implantación de la IA, ésta ha estado en un lento pero continuo avance, lo que llevó hace unos años al inicio de un cambio progresivo de la inseminación cervical convencional-CAI a una inseminación más profunda denominada PCAI.

A pesar de la expansión de esta nueva metodología de IA, existen todavía algunos limitantes como su uso en cerdas de reposición como son las hembras nulíparas (**artículo 1**). De hecho, el resultado obtenido de aplicación con el catéter de múltiparas aplicado a las cerdas nulíparas fue del 23.1% (**artículo 1**), situándose lejos de los éxitos alcanzados en cerdas múltiparas donde el grado de aplicación supera el 95% [3]. Estos resultados se debieron principalmente a la dificultad encontrada en atravesar el cérvix con la cánula del dispositivo de PCAI en este tipo de cerdas [4, 5]. Con el fin de incrementar el éxito de aplicación se pensó en primer lugar en el uso de productos que pudieran incrementar la luz del canal cervical en el momento de la IA. Para ello se aplicó, por un lado, un tratamiento farmacológico (Hidrocloruro de Vetrabutina-VC, Monzal[®]) que actúa como espasmolítico sobre las fibras lisas musculares uterinas produciendo relajación del tono de la musculatura uterina, y, por otro lado, con un tratamiento térmico a base de diluyente comercial (WE). Las cerdas que no pudieron ser inseminadas en este primer intento con el catéter de PCAI, mostraron un éxito de aplicación del dispositivo de inseminación del 34.2% para el grupo de nulíparas en las que se aplicó el

tratamiento VC, y de un 23.8% de éxito en el grupo en el que se aplicó WE. Estos resultados nos indican que una de las principales dificultades de la aplicación de PCAI en cerdas nulíparas es sin duda el diámetro del canal cervical, y que éste puede verse aumentando a través de diferentes tratamientos, como son la aplicación de VC o WE. Habiendo profundizado en el problema del uso de PCAI radica principalmente en poder atravesar la totalidad del canal cervical con la cánula interna, nos propusimos rediseñar el catéter de PCAI y adaptarlo a las hembras nulíparas. El primer diseño de dispositivo utilizado (GpC1) estaba basado en un catéter multianillas de menor diámetro (16 mm) que el utilizado en el catéter convencional de PCAI, pero con la misma cánula interna. El segundo diseño de dispositivo (GpC2) consistía en el mismo catéter multianillas del grupo GpC1, pero con una cánula de menor diámetro (2.5 mm). Los resultados mostraron que el dispositivo utilizado en el grupo GpC2, permitió un mayor éxito de penetración que el grupo GpC1, obteniendo un porcentaje de éxito del 60.3%, frente al 37.0% del GpC1. A pesar del incremento de eficiencia observado en este primer estudio mediante el uso de diferentes alternativas, el éxito de aplicación aún dista de poder considerarse como método de aplicación exitoso en este tipo de cerdas, ya que en el mejor de los casos se consigue una tasa de éxito del 60.3%, lejos todavía del éxito alcanzado en las cerdas multíparas (~95%) [3].

Lo que parece evidente es que existe una clara limitación en nulíparas de poder atravesar la parte craneal del cérvix, que en cerdas multíparas no se presenta. De esta forma, en el **artículo 2**, se compararon las características morfológicas del tracto genital de la hembra implicadas en PCAI entre cerdas nulíparas y multíparas con especial atención al cérvix del útero, planteando la hipótesis de que el envejecimiento y número de partos modifica el canal cervical, aumentando su elasticidad y por tanto la facilidad de aplicación de PCAI. La longitud total media del tracto reproductivo que debe ser pasada por la cánula en PCAI (vulva, vestíbulo vaginal, vagina y cérvix) fue superior en las cerdas multíparas. Este primer experimento nos llevó a plantearnos que quizás la longitud de cánula utilizada en PCAI de multíparas no es la adecuada para cerdas nulíparas, debido a que en el procedimiento de inseminación se considera que la cánula ha llegado a su punto de deposición correcto (cuerpo del útero), cuando la cánula se ha introducido en su

totalidad. En un segundo experimento se analizó la morfología y estructura de la parte vaginal (parte caudal, sección del cuello uterino en contacto con la vagina) y uterina (parte craneal, relacionada con el cuerpo uterino) del cérvix. Se observaron diferencias significativas tanto en el perímetro como en el área de cortes transversales de la sección uterina, a favor de las cerdas multíparas. Con estos datos obtenidos vamos dando fuerza a la hipótesis planteada de la presencia de diferencias morfológicas entre ambos grupos que limitan la utilización de dispositivos para PCAI de multíparas en cerdas nulíparas, empezando a enfocar el origen de la limitación de atravesar el canal cervical en la sección uterina de este tipo de hembras. Para poder comprender aún más cuales pueden ser los motivos de esta limitación de la parte uterina del cérvix, se diseñó el segundo estudio histológico de ambas secciones del cérvix. Los resultados obtenidos evidencian notables diferencias también enfocadas en la sección uterina entre ambos grupos de cerdas, donde el tejido conectivo está más presente en cerdas multíparas. Este tejido conectivo está compuesto principalmente por colágeno, proteína responsable de las propiedades de tracción, el cual confiere la flexibilidad al cuello uterino [6,7], lo que puede explicar la mayor facilidad para atravesar el cuello uterino en cerdas multíparas con la cánula del dispositivo para PCAI. Por otro lado, en cerdas nulíparas el mayor contenido de fibras musculares de la sección uterina puede explicar la elevada dificultad durante dicho proceso de PCAI. Con estos datos obtenidos hasta ahora podemos dar consistencia a la hipótesis propuesta de que por un lado la edad y la paridad en las cerdas influyen en el desarrollo y la composición de canal cervical, y por otro lado como vimos en el experimento 1 del primer artículo utilizando Monzal® como relajante muscular, los resultados mejoraron debido, como ahora hemos comprobado, al alto contenido en fibras musculares de la sección final del cérvix.

Para la realización del **artículo 3** se diseñó un nuevo dispositivo de IA, en base a los resultados morfométricos medios obtenidos en el artículo 2, diseñado específicamente para su uso en cerdas nulíparas, teniendo en cuenta sus limitaciones anatómicas y permitiendo la deposición profunda en el cuello uterino, denominado *Inseminación Artificial Cervical-Profunda* (Dp-CAI). Este nuevo dispositivo de inseminación está compuesto por dos elementos principales. Por un

lado, un catéter cervical tipo multianillas, con un diámetro de 17 mm, y una longitud de 52 cm. Dentro de este catéter va insertada una cánula flexible con un diámetro de 3 mm, y una longitud de 65 cm (**Figura 1a**). Su diferencia más significativa frente al dispositivo utilizado en PCAI de multíparas, es la longitud de la cánula interna, por lo que la penetración total de la cánula desde la salida craneal del catéter es de 8 cm, en comparación con los 16 cm de la cánula del dispositivo de multíparas. Con el uso de Dp-CAI se consiguió un éxito de aplicación cercano al 90% de las cerdas nulíparas, siendo éste un rendimiento muy próximo al conseguido en las cerdas multíparas y, por otro lado, hemos mejorado la tasa de éxito obtenida con la aplicación de los nuevos catéteres diseñados para nulíparas en el artículo 1 (la tasa más alta era de ~60%). Además, se midió la distancia del catéter que se quedaba en el exterior de la cerda cuando se inseminaba con el dispositivo de Dp-CAI, siendo ésta de 27.23 cm. Esta información junto con las mediciones realizadas en el artículo 2 del tracto genital de la hembra y las dimensiones del nuevo dispositivo, nos confirma que el semen es depositado en la parte craneal del cérvix con este nuevo método de IA (**Figura 1b**).

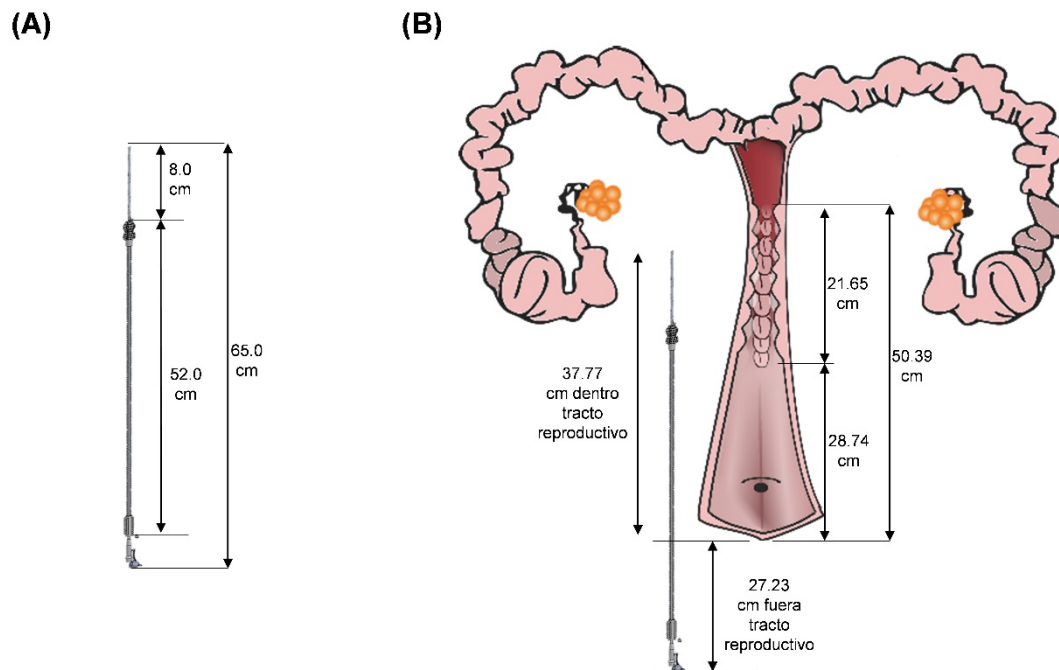


Figura 1. Inseminación Artificial Intracervical-Profunda (Dp-CAI) en cerdas nulíparas. A) Ilustración del dispositivo de inseminación y dimensiones de éste. B) Disposición del dispositivo de Dp-CAI en el tracto reproductor de una hembra nulípara durante una inseminación artificial en base a los datos obtenidos en los artículos 2 y 3.

Además, se evaluaron los resultados reproductivos entre los dos grupos experimentales (CAI vs. Dp-CAI). Para ello, se utilizó una dosis seminal de 1.5×10^9 células espermáticas/45ml para el grupo de hembras inseminadas con Dp-CAI, y 2.5×10^9 células espermáticas/85 ml en el grupo control CAI. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre las dos metodologías de inseminación, siendo el rendimiento reproductivo alcanzado similar entre ambos métodos. Con todo ello este nuevo diseño Dp-CAI puede ser una alternativa a la utilización de la técnica CAI en cerdas nulíparas, ya que hemos mejorado el éxito de aplicación de otras técnicas profundas ya estudiadas [8], con la ventaja que presenta poder mantener resultados reproductivos con la importante reducción en cuanto a la cantidad de material seminal necesario. Todo ello conlleva beneficios importantes en el sector de producción porcina, como es la homogenización de la técnica de inseminación de toda la población de cerdas presentes en la granja, una mayor presión en la selección de los reproductores con mayores índices, y la unificación en el formato de dosis seminal elaborada en los centros de inseminación. Por otro lado, debemos tener en cuenta los posibles beneficios económicos que esto conlleva. Se ha demostrado que el uso del método de PCAI en cerdas multíparas consigue reducir el coste económico derivado de la inseminación [9,10]. En el caso de Dp-CAI y teniendo en cuenta nuestros resultados, podemos establecer de forma directa un ahorro por cada ciclo de cubrición, formado por dos inseminaciones por nulípara, en 1.20 €, debido al menor coste de 0.90 € al utilizar una dosis seminal de 45 ml respecto a una de 85 ml, y aunque el coste del dispositivo para Dp-CAI es 0.30 € más elevado que el de CAI, su valor es compensado por el ahorro económico al utilizar dosis de 45 ml. En la Tabla 1 se detalla el coste por inseminación de una cerda nulípara y el beneficio entre ambas técnicas.

Tabla 1. Evaluación de los costes económicos directos por inseminación comparando el uso de CAI vs. Dp-CAI.

	CAI	Dp-CAI
Cubrición	5.82 €	5.22 €
Catéter	0.12 €	0.42 €
Dosis de semen (85 ml-45 ml)	3.70 €	2.80 €
Nº dosis/cubrición	2	2
Coste Total/cubrición nulípara	7.64 €	6.44 €
Ahorro cubrición nulípara usando Dp-CAI	0.00 €	1.20 €

En definitiva, el éxito en la aplicación de PCAI en cerdas nulíparas es considerablemente bajo en comparación con las cerdas multíparas debido a limitaciones anatómicas centradas principalmente en la parte uterina del cuello uterino como hemos observado. El beneficio económico en la aplicación de Dp-CAI, sumado a otros factores ya mencionados como el mayor aprovechamiento genético de los verracos, la estandarización del tipo de dosis seminal y del método de aplicación utilizado para llevar a cabo la inseminación de todas las cerdas presentes en una granja, hacen de este método una alternativa de aplicación al método CAI, actualmente utilizado en la población de cerdas nulíparas presentes en las granjas comerciales.

Referencias

- [1] Consumo per cápita de carne por región. OCDE/FAO (2019). OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas, Estadísticas de la OCDE sobre agricultura (base de datos) <http://dx.doi.org/10.1787/888934000970>.
- [2] Boyd RD, Zier-Rush CE, Moeser AJ, Culbertson M, Stewart KR, Rosero DS, Patience JF. Review: innovation through research in the North American pork industry. *Animal* 2019;13: 2951–2966. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001915>.
- [3] Watson PF, Behan JR. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology* 2002;57:1683-1693. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00648-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00648-9).
- [4] Levis DG, Burroughs S, Williams S. Use of intra-uterine insemination of pigs: pros, cons & economics. Faculty Papers and Publications in Animal Sciences. Paper 618. Lincoln, Nebraska, USA: University of Nebraska-Lincoln, digitalCommons@University of Nebraska-Lincoln, <http://digitalcommons.unl>. 2001.
- [5] Kapelanski W, Jankowiak J, Bocian M, Grajewska S, Dybala J, Zmudzinska A. Morphometric characteristics of the reproductive system in Polish Large White and Polish Landrace gilts at 100 kg body weight. *Ann Anim Sci* 2013;13:45-53. <https://doi.org/10.2478/v10220-012-0057-8>.
- [6] Leppert PC. Anatomy and physiology of cervical ripening. *Clin Obstet Gynecol* 1995;38:267-79. <https://doi.org/10.1097/00003081-199506000-00009>
- [7] Rodríguez-Antolín J, Nicolas L, Cuevas E, Bravo I, Castelan F, Martínez-Gomez M. Morphological characteristics of the cervix in domestic sows. *Anat Sci Int* 2012;87:195-202. <https://doi.org/10.1007/s12565-012-0147-9>.
- [8] Ulguim RR, Vier CM, Betiolo FP, Sbardella PE, Bernardi ML, Wentz I, Mellagi AP, Bortolozzo FP. Insertion of an intrauterine catheter for postcervical artificial insemination in gilts: a case report. *Semina: Ciencias Agrarias* 2018;39:2883-8. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n6p2883>.
- [9] Hernández-Caravaca I, Izquierdo-Rico MJ, Matás C, Carvajal JA, Vieira L, Abril D, Soriano-Úbeda C, García-Vázquez FA. Reproductive performance and backflow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows. *Anim Reprod Sci* 2012;136:14-22. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.007>.
- [10] Gonzalez-Peña D, Knox RV, Rodriguez-Zas SL. Contribution of semen trait selection, artificial insemination technique, and semen dose to the profitability of pig production systems: A simulation study. *Theriogenology* 2016;85:335-44. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.014>.

7. Conclusiones/Conclusions

Conclusiones

• Artículo 1:

1. El método actual de inseminación artificial post-cervical, así como el catéter utilizado en cerdas multíparas tienen una baja tasa de éxito en hembras nulíparas.

2. El uso de inseminación artificial post-cervical combinada con tratamientos específicos (hidrocloruro de vetrabutina o diluyente caliente) o el diseño de nuevos dispositivos de inseminación artificial post-cervical adaptados a las cerdas nulíparas aumenta la tasa de éxito de esta técnica sin afectar los parámetros reproductivos.

• Artículo 2:

3. La paridad de la cerda, también influenciada por el envejecimiento, determina cambios importantes en el tamaño, la estructura y el contenido tisular de la pared del cuello uterino, así como en la morfología del canal cervical, con especial énfasis en la parte uterina del cuello uterino.

• Artículo 3:

4. La aplicación de la inseminación artificial cervical profunda utilizando un nuevo dispositivo diseñado específicamente para cerdas nulíparas permite que los espermatozoides se depositen profundamente en el cuello uterino con un alto grado de éxito.

5. La técnica de inseminación artificial cervical profunda se puede utilizar con éxito en cerdas nulíparas en lugar del método de inseminación artificial cervical comúnmente utilizado, reduciendo el número de espermatozoides utilizados por inseminación sin afectar el rendimiento reproductivo.

Conclusions

- **Article 1:**

1. The post-cervical artificial insemination method and catheter currently used in multiparous sows have a low rate of success in gilts.

2. The use of post-cervical artificial insemination combined with specific treatments (vetrabutrine chlorhydrate or warm extender) or newly designed artificial insemination devices adapted to the gilt anatomy increases the rate of successful cannula introduction for carrying out post-cervical artificial insemination without impairing reproductive parameters.

- **Article 2:**

3. Parity, which is also influenced by ageing, determines important changes in the size, structure and tissue content of the cervix wall, as well as in the morphology of the cervical canal, especially in the uterine part of the cervix.

- **Article 3:**

4. The application of deep-cervical artificial insemination using a new device specifically designed for gilts permits spermatozoa to be deposited deeply in the cervix with a high degree of success.

5. The use of deep-cervical artificial insemination in gilts rather than the commonly used cervical artificial insemination method reduces the number of spermatozoa needed per insemination without impairing reproductive performance.

8. Abreviaturas/Abbreviations

Abreviaturas/Abbreviations

- IA/AI: Inseminación Artificial/Artificial Insemination.
- CAI: Inseminación Artificial Cervical/Cervical Artificial Insemination.
- Cx: Cérvix/Cervix.
- Dp-CAI: Inseminación Artificial Cervical Profunda/Deep-Cervical Artificial Insemination.
- GpC1: Dispositivo 1 de inseminación post-cervical para cerdas nulíparas/Gilt post-cervical device 1.
- GpC2: Dispositivo 2 de inseminación post-cervical para cerdas nulíparas/Gilt post-cervical device 2.
- MpC: Dispositivo de inseminación artificial post-cervical en cerdas múltiparas/Post-cervical artificial insemination catheter for multiparous females.
- PCAI: Inseminación Artificial Post-Cervical/Post-Cervical Artificial Insemination.
- UB: Cuerpo del útero/Uterus body.
- V: Sección pre-uterina/Pre-uterine reproductive tract.
- VC: Hidrocloruro de Vetrabutina/Vetrabutin Chlorhydrate.
- WE: Diluyente comercial atemperatdo/Warm commercial extender.

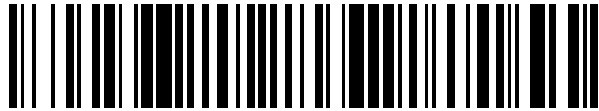
9. Anexo I: Patente

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 378**

21 Número de solicitud: 201600600

51 Int. Cl.:

A61D 19/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

12.07.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.02.2017

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE MURCIA (100.0%)
Oficina de Transferencia de Resultados de
Investigación (OTRI). Vicerrectorado de
Investigación e Internacionalización. Campus
Universitario de Espinardo, Edificio Rector Soler,
1ª planta
30100 Murcia ES**

72 Inventor/es:

**GARCIA VÁZQUEZ, Francisco Alberto y
LLAMAS LÓPEZ, Pedro José**

54 Título: **Dispositivo de inseminación intracervical profunda en ganado porcino.**

57 Resumen:

Dispositivo de inseminación intracervical profunda en ganado porcino. Comprende un catéter cuyo extremo anterior queda acoplado en el cérvix del animal mediante una pieza adherida presente en la parte anterior del mismo; en el interior del catéter discurre una cánula de menor diámetro y que se extiende más allá de aquel y en cuyo extremo anterior se encuentra un tapón con un acabado redondeado para evitar lesiones en la mucosa de la cerda y que cuenta con al menos un orificio de salida frontal del semen, permitiendo el depósito de este en la parte más craneal del cérvix. El extremo contrario de la cánula está diseñado para ser acoplado en la parte trasera del catéter y así evitar pérdidas de fluidos durante la inseminación y la retracción de la cánula. El dispositivo, con aplicación preferente en cerdas nulíparas, permite optimizar las condiciones de inseminación artificial.

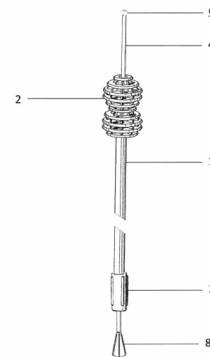


Figura 1

ES 2 600 378 A1

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de inseminación intracervical profunda en ganado porcino.

5 **Objeto de la invención**

El objeto de la presente invención es proporcionar un dispositivo sencillo y de fácil uso para introducir semen a nivel cervical profundo en cerdas, extendiendo dicho depósito hasta la zona más craneal del cérvix del útero del animal, alcanzando por tanto mayor profundidad que la inseminación cervical tradicional, y reduciendo las pérdidas espermáticas por reflujo a través del dispositivo durante la inseminación, gracias al acoplamiento manual que se produce entre la cánula y el catéter en la parte posterior del dispositivo. Todo ello permite utilizar una menor cantidad de semen en cada inseminación obteniendo rendimientos productivos similares o mejores respecto a técnicas tradicionales. Este dispositivo, debido a su diseño y dimensiones, es de especial aplicación en cerdas jóvenes, especialmente nulíparas, ya que el uso de la inseminación post-cervical o intrauterina en este tipo de animales es muy limitado, o prácticamente nulo, y por tanto presenta una alternativa a la inseminación cervical tradicional.

20 **Sector de la técnica**

La presente invención se encuadra dentro del campo de los dispositivos de la medicina veterinaria, en concreto en el ámbito de los instrumentos para la reproducción o fertilización mediante inseminación artificial en ganadería porcina.

25

Antecedentes de la invención y estado de la técnica

En las últimas dos décadas las tecnologías de reproducción asistida se han incrementado de manera exponencial debido al desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas tanto en la especie humana como animal. La inseminación artificial (IA) está incluida entre estos métodos. Esta técnica aunque no es tan nueva como pueden ser otras, es considerada todavía como una de las técnicas más revolucionarias aplicadas en animales de granja. La IA se puede definir como un método de reproducción asistida donde los espermatozoides se depositan de manera artificial en el tracto genital de la hembra con el fin de fecundarla. Hoy en día, más del 90% de las cerdas son inseminadas artificialmente en la Unión Europea y Norte de América, llegando a alcanzar el 98% en determinados países. La IA presenta grandes ventajas respecto a la monta natural, como pueden ser mejoras genéticas debido al uso de machos de alto valor, menor riesgo sanitario, ahorro económico, facilidad de manejo, control de la calidad seminal, etc.

40

El objetivo principal durante una IA, así como de la monta natural, es que una población adecuada de espermatozoides alcance el lugar de fecundación durante el periodo peri-ovulatorio. Durante una monta natural se deposita en el tracto genital de la hembra un elevado volumen de fluido seminal (~200-500 ml) y número de espermatozoides (~20.000-70.000 x10⁶).

45

La IA a nivel cervical ha sido la técnica de inseminación más utilizada en la especie porcina en todo el mundo. Dicha técnica es sencilla de realizar en condiciones de campo y básicamente consiste en el depósito del semen en la zona más craneal del cérvix del útero del animal mediante el uso de un catéter, simulando las condiciones naturales que ocurrirían durante una monta natural. Mediante esta técnica las hembras son

50

inseminadas con 3.000×10^6 de espermatozoides en un volumen de 80-100 ml, obteniendo resultados de fertilidad de alrededor de un 90% y entre 10-14 lechones nacidos totales.

5 Pero en las últimas dos décadas se han desarrollado nuevas estrategias de IA con la idea de depositar el semen más cerca del lugar de fecundación de lo que lo haría la IA cervical, reduciendo de esta manera el volumen y el número de espermatozoides. Una de estas técnicas es la denominada IA post-cervical o inseminación intrauterina, la cual
10 consiste en la deposición del semen en el cuerpo del útero, justo después del cérvix y antes de la bifurcación de los cuernos uterinos. La IA post-cervical se lleva a cabo mediante la combinación de un catéter (como los que se usan en la IA cervical) y una cánula que discurre por el interior del catéter y permite depositar el semen 16-20 cm más en profundidad de lo que lo haría la IA cervical.

15 Los estudios experimentales de aplicación de la IA post-cervical a nivel de granja han permitido constatar que ofrecen mejores resultados respecto a la aplicación de la IA cervical, reduciendo el semen depositado a la mitad (1.500×10^6 espermatozoides/40 ml) o a un tercio (1.000×10^6 espermatozoides/26 ml) del utilizado en la IA cervical (3.000×10^6 espermatozoides/80 ml).

20 Por tanto, son varias las ventajas que presenta este nuevo tipo de IA respecto a las técnicas tradicionales, como son el ahorro económico al aumentar el número de cerdas que se pueden inseminar con un solo macho, tener menor número de verracos en granja, producto final más homogéneo, ahorro de tiempo en la aplicación de IA, etc.

25 El principal problema de la IA post-cervical es que no es posible su aplicación, o es muy limitada, en cerdas jóvenes como son las cerdas nulíparas, es decir, en cerdas que han entrado en edad fértil pero no han tenido descendencia. Este tipo de hembras es la base de las granjas y supone como media más del 20% de la población de hembras
30 reproductoras en una explotación porcina.

Los estudios realizados aplicando la IA post-cervical en cerdas nulíparas son muy limitados, y con resultados dispares. Los estudios demuestran que el uso de la IA post-cervical no es tan efectivo como en cerdas múltiparas, ya que solo un 23% de las cerdas
35 nulíparas se pudieron inseminar con los catéteres comerciales actuales de IA post-cervical utilizados en cerdas múltiparas.

El principal limitante encontrado en la aplicación de la inseminación post-cervical en las cerdas nulíparas es la dificultad en la inserción del catéter de inseminación, sobre todo en
40 la parte más profunda (parte craneal) del cérvix, siendo mucho más difícil que en cerdas múltiparas. Se ha demostrado que el borrado del cuello uterino durante el parto induce cambios la matriz conectiva del cérvix, de modo que su pared se hace más laxa y distensible. Esta razón junto con el escaso desarrollo del aparato reproductor de las cerdas nulíparas impide que el sistema de IA post-cervical se pueda aplicar a este tipo de
45 cerdas con garantías.

La presente invención viene a ofrecer una solución a este problema a través de un nuevo dispositivo de IA cuya principal novedad es que está diseñado en base a la morfología y dimensiones específicas del aparato reproductor de la cerda nulípara que permite la
50 deposición del semen no en la región post-cervical, después del cérvix, debido a su imposibilidad anatómica en atravesarla, sino en la región cervical profunda, es decir, la

parte anterior del cérvix. Además este dispositivo evita la pérdida de fluidos seminales a través del catéter durante la inseminación por lo que se maximiza el rendimiento. Por todo esto este dispositivo aumenta considerablemente el porcentaje de éxito de la aplicación actual que tiene la IA post-cervical en nulíparas, obteniendo resultados similares o incluso mejores de fertilidad y prolificidad que el uso de la IA cervical convencional. Se trata de un dispositivo de sencilla aplicación y fácil uso a nivel de granja y aunque es un instrumento concebido principalmente para su aplicación en cerdas nulíparas, su uso también puede extenderse al resto de cerdas (primíparas y multíparas).

10 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo que permite depositar el semen en la parte craneal del cérvix del útero de una cerda y que posibilita la inseminación intracervical profunda de la misma, evitando a la vez la pérdida de fluido espermático a través del dispositivo durante la inseminación.

Este dispositivo viene a cumplir con el objetivo de lograr una inseminación más profunda respecto a la que se consigue con la inseminación tradicional cervical en aquellas cerdas donde no se puede aplicar la inseminación intrauterina (en su mayor parte cerdas nulíparas). Para ello, este dispositivo permite la deposición del semen en la parte craneal del cérvix del útero del animal de la cerda, con lo que se consigue reducir el número de espermatozoides a depositar con respecto a la inseminación cervical convencional, obteniendo resultados productivos similares o mejores respecto a los tradicionales sistemas de inseminación cervical.

La invención está constituida por un catéter de inseminación cervical estándar de forma tubular y hueco, elaborado en materiales flexibles, preferentemente plástico, en el que su extremo anterior, empleado para su introducción en el aparato reproductor de la cerda, presenta una pieza adherida, que puede tener una morfología diversa aunque preferiblemente en espiral o en anillas concéntricas y sucesivas, que permite su fijación al cérvix de la cerda debido a las características anatómicas de la misma, mientras que su extremo posterior termina en un engrosamiento que hace las veces de mango y que facilita su sujeción. El objeto de la invención viene determinado porqué por el interior del catéter discurre de manera axial una cánula hueca de tamaño no inferior a 50 cm ni superior a 59.9 cm de longitud y con un grosor no inferior a 1.5 mm y no superior a 3.49 mm, basadas en las características anatómicas de la cerda nulípara. Esta cánula está elaborada en materiales flexibles, y es de menor diámetro que el catéter que lo recibe, estando diseñada para permitir el depósito del semen a nivel intracervical profundo, en concreto en la parte craneal del cérvix.

Dicha cánula transcurre por el interior del catéter y emerge por su extremo anterior atravesando parte del cérvix hasta llegar al punto de depósito del semen. La cánula está rematada en su extremo anterior en un tapón redondeado, que puede tener forma esférica o cilíndrica, de diámetro ligeramente superior o igual al diámetro de la cánula y menor o igual al diámetro interno del cuerpo tubular del catéter y consta de un orificio frontal que permite la salida y el depósito del semen. Alternativamente el tapón puede presentar un número variable de orificios de igual o menor tamaño al que tendría el orificio frontal señalado anteriormente y que pueden estar dispuestos a nivel lateral o bien a nivel frontal de dicho tapón. Por otro lado, la parte posterior de la cánula cuenta con un orificio que sirve de conexión entre el interior de la cánula y el exterior para adaptar los botes o bolsas que contienen el semen para la inseminación. En dicho extremo se

encuentra una pieza, que puede adoptar forma cónica o cilíndrica, que recubre la parte final de la cánula y que a su vez puede acoplarse, mediante presión manual, a la parte trasera del catéter, evitando la pérdida de fluidos y la retracción de la cánula hacia el exterior.

5

En aquellas cerdas problemáticas en las que sea dificultosa la entrada de la cánula a través del cérvix se puede hacer uso de una guía flexible, preferiblemente metálica, y no traumática que discurre de manera axial por el interior de la cánula y sale por el orificio frontal de la misma, facilitando la búsqueda del orificio de entrada del cérvix para posteriormente introducir la cánula con éxito. Una vez situada la cánula de manera correcta mediante la ayuda de la guía, ésta será retirada para la posterior deposición del semen.

10

El semen es introducido por la cavidad axial de la cánula interna hasta su salida por el extremo anterior redondeado siendo depositado a nivel de la parte anterior del cérvix. Las características descritas del dispositivo de inseminación intracervical profunda referido a la invención permite depositar el semen en la profundidad del cérvix, asegurando unos óptimos resultados productivos con el uso de 1.500x1 06 espermatozoides, e incluso cantidades menores, lo que supone una reducción considerable de la cantidad de semen habitualmente utilizado en la inseminación cervical tradicional (3.000x1 06). Además el hecho de inseminar en mayor profundidad a través del nuevo dispositivo de inseminación objeto de la invención da lugar a una menor pérdida de la dosis espermática introducida debido al reflujo a través de la vulva, ya que el volumen (%) y la concentración espermática (%) recolectados en el reflujo son menores mediante el uso del dispositivo de la invención que con el uso de la inseminación cervical tradicional. Además evita la pérdida de fluidos, y en consecuencia espermatozoides, a través de la parte posterior del catéter cervical durante la inseminación debido a que la pieza cónica que recubre la parte posterior de la cánula permite su ajuste a la parte posterior del catéter.

15

20

25

30

Descripción de las figuras

FIG. 1. Representación en alzado lateral del dispositivo de inseminación artificial.

35

FIG. 2. Representación en alzado del dispositivo de inseminación artificial y del orificio de entrada de los fluidos a través de la cánula.

FIG. 3. Vista de la sección transversal del conjunto del dispositivo.

40

FIG. 4. Vista general del dispositivo con la guía flexible que discurre por el interior de la cánula.

FIG. 5. Vista de la sección transversal del conjunto del dispositivo en su acoplamiento entre el catéter y la cánula en su parte posterior.

45

FIG. 6. Vista detallada y ampliada del extremo final redondeado de la cánula.

FIG. 7. Vista esquemática de la sección transversal del tracto reproductivo de una cerda con el conjunto catéter/cánula insertado en el tracto genital del animal.

50

FIG. 8. Vista de otra forma de realización alternativa de una cánula interna con el tapón redondeado del extremo anterior con diferentes canales de salida.

Lista de referencias

1. Catéter tubular.
- 5 2. Pieza adherida a la parte anterior del catéter que permite su fijación al cérvix de la cerda.
3. Engrosamiento externo de la parte posterior del catéter.
- 10 4. Cánula.
5. Tapón redondeado del extremo anterior de la cánula.
6. Orificio frontal del tapón redondeado.
- 15 7. Orificio para recibir el acoplamiento de bolsas o botes de dosis seminales.
8. Pieza en forma cónica de la parte posterior de la cánula.
- 20 9. Guía flexible que discurre por el interior de la cánula.
10. Acoplamiento del dispositivo cánula-catéter en su parte posterior.
11. Parte posterior del cérvix del aparato reproductor de la cerda donde se deposita el semen.
- 25 12. Orificios laterales del tapón redondeado del extremo anterior de la cánula.

Descripción de un modo de realización preferente de la invención

30 El dispositivo de inseminación descrito en la presente invención queda representado por un catéter tubular **1** de longitud y diámetro apropiados, terminado con unas aberturas frontales en sus extremos. La parte anterior de dicho catéter incorpora una pieza adherida **2** con morfología en forma de anillas concéntricas y sucesivas que permite su fijación al cérvix de la cerda, mientras que su extremo posterior termina en un engrosamiento **3** que hace las veces de mango y que facilita su sujeción por parte de la persona que lo manipula.

40 A partir de esta estructuración y de acuerdo con la presente invención, por el interior del catéter tubular discurre de manera axial una cánula hueca **4** con una longitud mayor y un diámetro menor que el del catéter, permitiendo llegar más en profundidad en el interior del tracto genital de la hembra. El extremo anterior de la cánula, termina en un tapón **5** esférico que cuenta con un diámetro igual o superior a la parte tubular de la cánula interna y menor o igual al diámetro interno del cuerpo tubular del catéter, siendo éste apto para desplazarse a lo largo del cuello uterino sin erosionar ni dañar su mucosa. Este tapón presenta un orificio **6** en su parte frontal para la salida y vertido del semen, en la zona craneal del cérvix del útero de la cerda a inseminar, comunicando la parte exterior con el interior. El tapón esférico en el que termina la cánula puede poseer diferentes canales u orificios de salida con diferentes diámetros **12**, que pueden ser frontales y/o laterales a la cánula.

La cánula se introduce en el catéter por el que discurre hasta llegar al cérvix de la hembra. El extremo posterior de la cánula está preparado con un orificio **7** para recibir el acoplamiento de bolsas o botes de dosis seminales. En La parte posterior de la cánula se acopla una pieza en forma cónica **8** que a su vez permite su ajuste en la parte trasera del catéter **10** para evitar la retracción y desplazamiento de la cánula, así como la pérdida de fluido seminal a través del catéter durante la inseminación. En el caso de dificultad en la introducción de la cánula a través del cérvix el dispositivo está provisto de una guía metálica flexible **9** que discurre por el interior de la cánula y que facilita la búsqueda del orificio de entrada del cérvix para posteriormente introducir la cánula con éxito.

5

10

En la figura 7 se puede observar como el extremo de la cánula llega a la parte craneal del cérvix donde se depositaría el fluido o semen **11**.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, que está previsto para introducir esperma en la zona craneal del cérvix del útero del animal (11), que comprende un catéter tubular (1) cuyo extremo posterior incluye un engrosamiento constitutivo de un mango de sujeción (3) y en cuya parte anterior presenta una pieza adherida (2) que facilita su introducción y fijación en la entrada del conducto cervical; **caracterizado** porque en el interior del catéter (1) se ha previsto una cánula hueca (4), emergente a través del extremo anterior de dicho catéter; dicha cánula (4) termina en su extremo anterior en forma de tapón redondeado (5) de diámetro igual o ligeramente superior al diámetro de la cánula (4) y que presenta un orificio a nivel frontal (6) para la salida del semen, mientras que su extremo posterior presenta una pieza (8) que recubre la parte final de dicha cánula y que a su vez se acopla a la parte trasera del catéter (1).
2. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la cánula (4) presenta una longitud mayor que el conjunto que determina el catéter tubular (1), y el engrosamiento posterior de éste (3), siendo dicha longitud suficiente para que la cánula (4) en su introducción máxima en la hembra porcina sea apta para alcanzar la zona craneal del cérvix (11).
3. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la cánula (4) presenta en su extremo posterior un orificio (7) apto para recibir las bolsas o botes que contienen el semen a inocular.
4. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la longitud de la cánula (4) es inferior a 59.9 cm y superior a 50 cm.
5. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el diámetro de la cánula (4) es inferior a 3.49 mm y superior a 1.5 mm.
6. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por que por el interior de la cánula (4) discurre una guía (9) que facilita el paso de la cánula (4) por el canal cervical y que se retira en el momento de la deposición del semen.
7. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, según reivindicación 6, **caracterizado** porque la guía (9) está elaborada en cualquier tipo de material flexible.
8. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, según reivindicación 1, **caracterizado** porque el tapan redondeado (5) tiene forma cilíndrica.
9. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, según reivindicación 1, **caracterizado** porque el tapón redondeado (5) tiene forma cónica.
10. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, según reivindicaciones 1, 8 y 9, **caracterizado** porque el tapón redondeado (5) posee un

número variable de orificios dispuestos a nivel frontal o lateral (12) para la salida del semen.

5 11. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, según reivindicación 10, **caracterizado** porque los orificios dispuestos a nivel frontal o lateral (12) presentan un diámetro variable.

10 12. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la pieza (8) presente en el extremo posterior de la cánula (4) y que se acopla a la parte posterior del catéter tubular (1) tiene forma cónica.

15 13. Dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la pieza (8) presente en el extremo posterior de la cánula (4) y que se acopla a la parte posterior del catéter tubular (1) tiene forma cilíndrica.

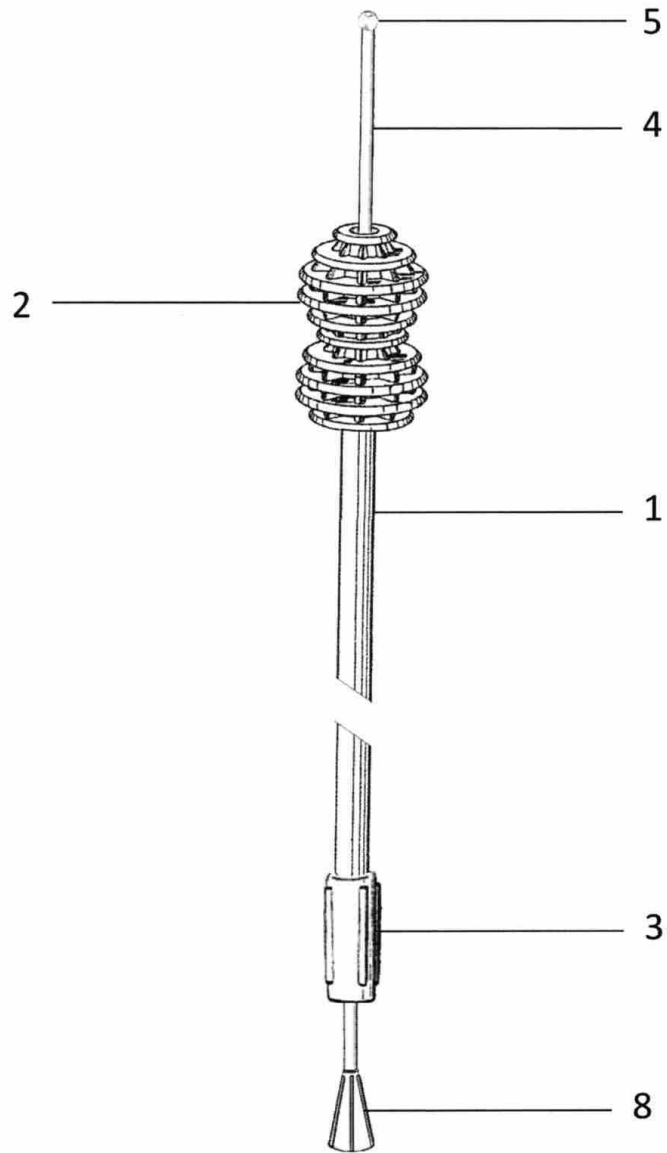


Figura 1

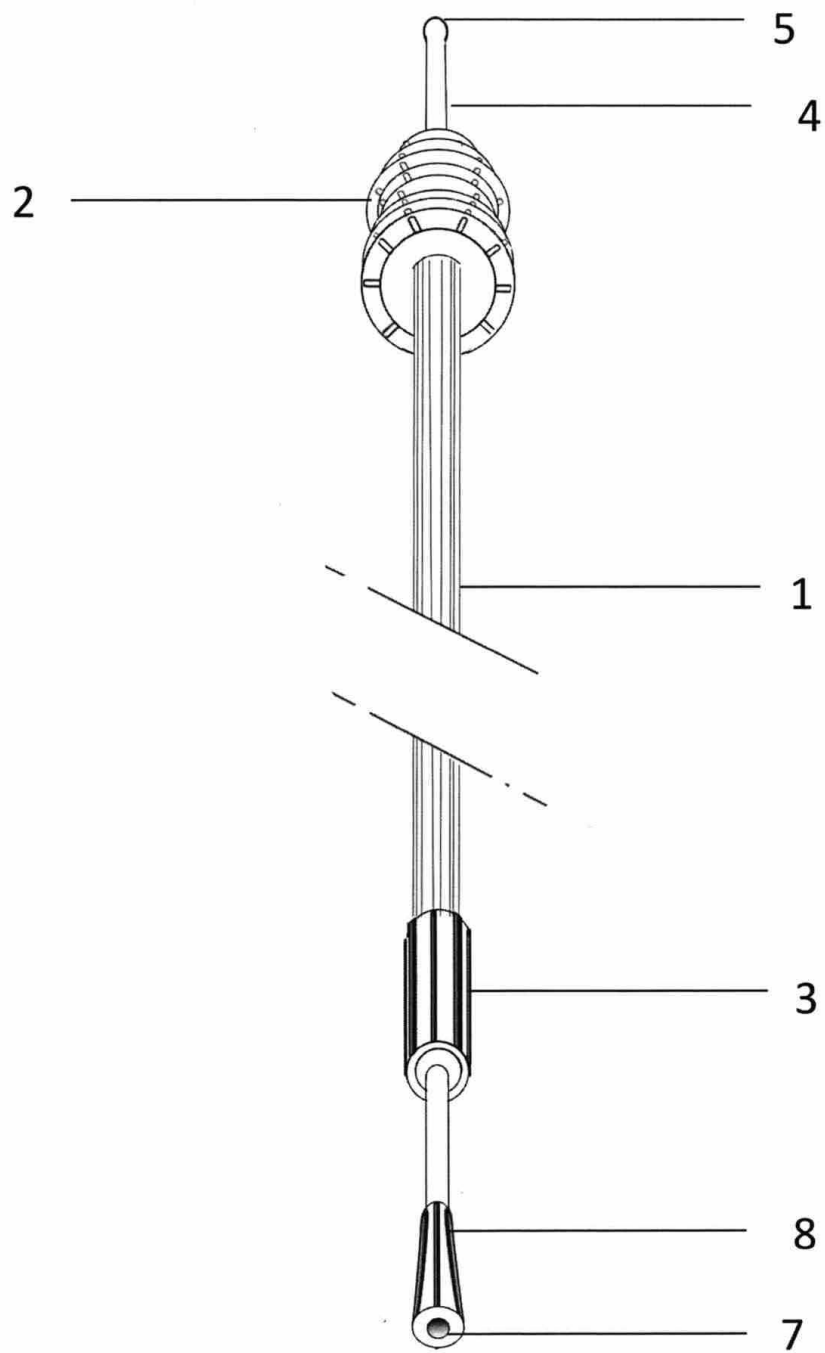


Figura 2

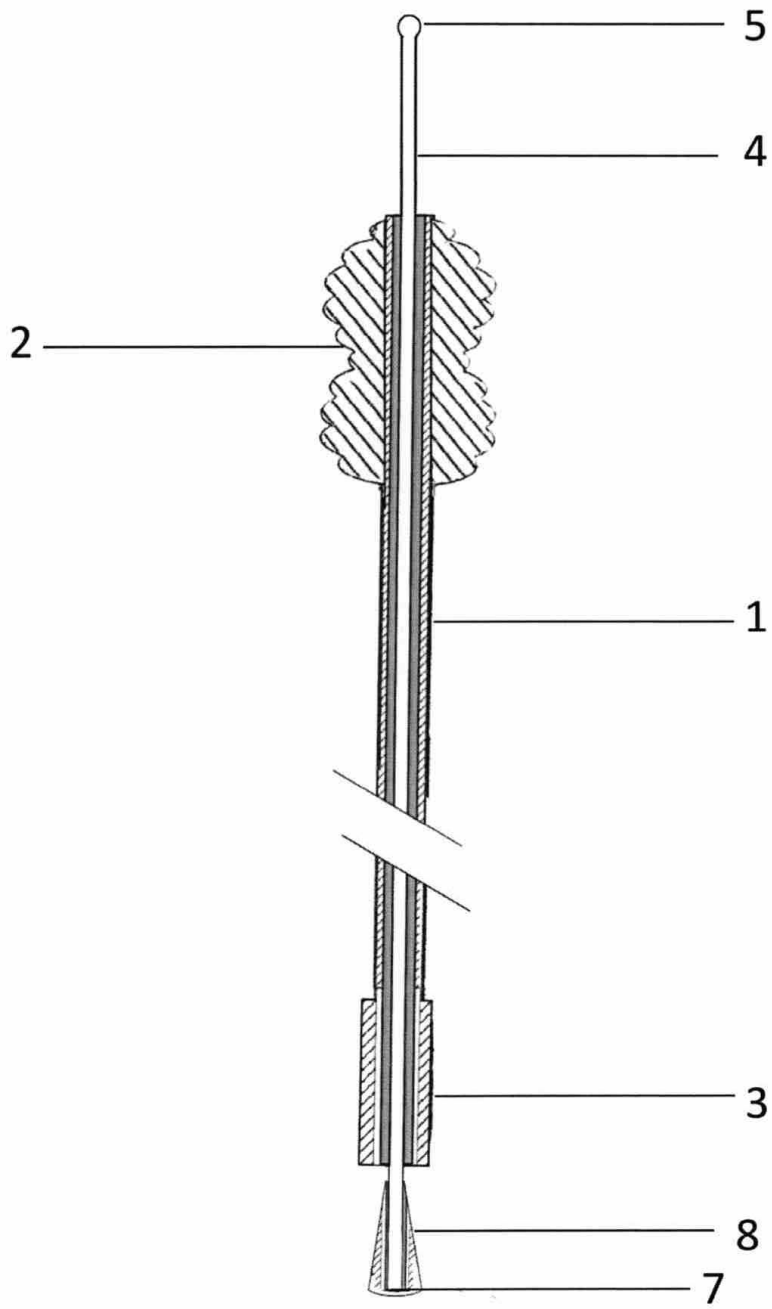


Figura 3

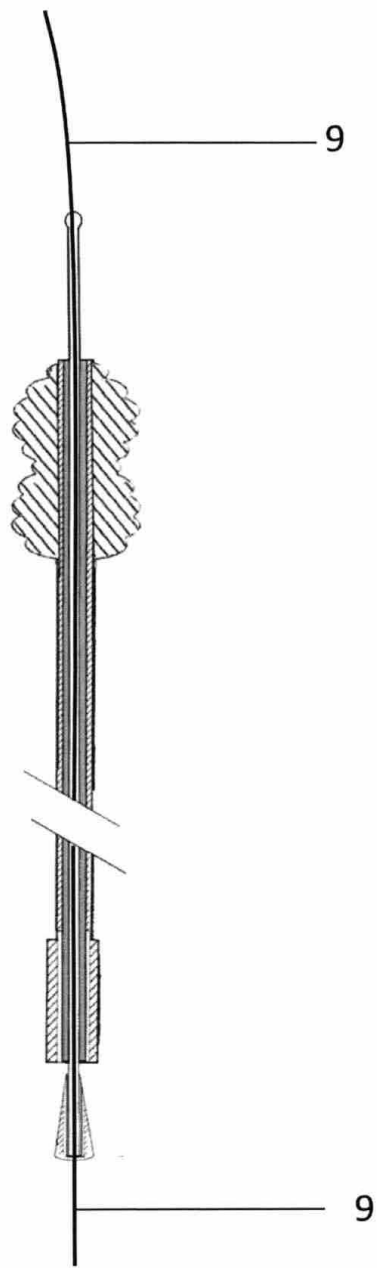


Figura 4

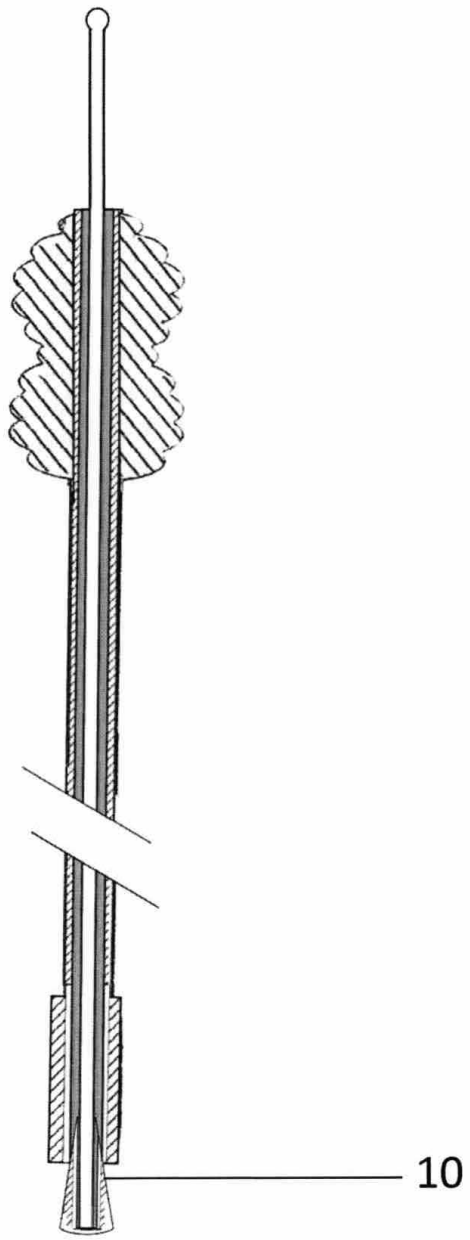


Figura 5

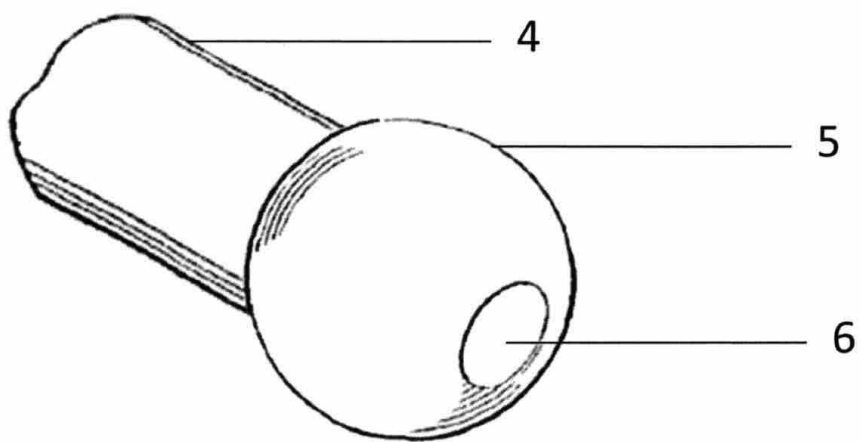


Figura 6

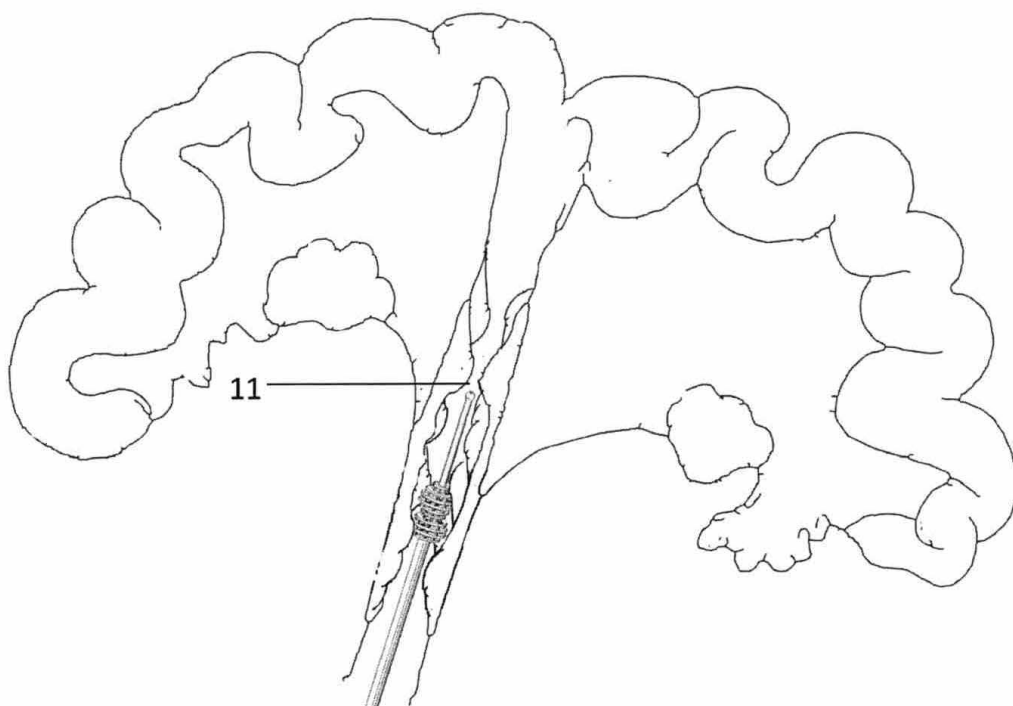


Figura 7

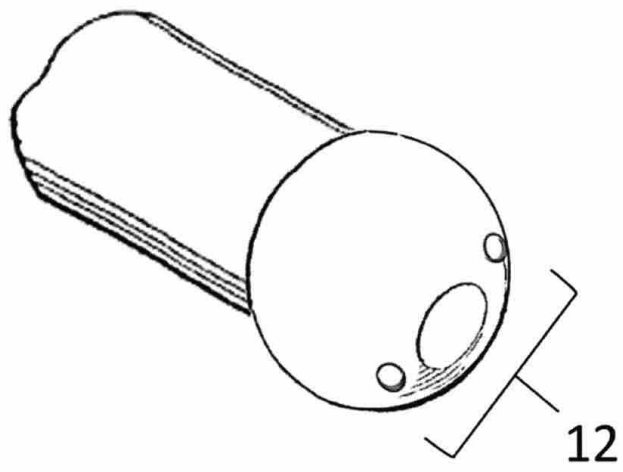


Figura 8



- ②① N.º solicitud: 201600600
②② Fecha de presentación de la solicitud: 12.07.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61D19/02** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 0149205 A1 (IBERICA DE REPRODUCCION ASISTIDA) 12/07/2001, Página 9, línea 30 - página 12, línea 11; figuras 1-5.	1-5, 8-11, 13
A	WO 0152767 A1 (UNIVERSIDAD DE MURCIA) 26/07/2001, página 3, línea 11 - página 5, línea 5; página 7, línea 19 - página 9, línea 2; figuras 1-4.	1-11
A	ES 2247318 T3 (MINITUBE OF AMERICA INC.) 01/03/2006, columna 3, línea 64 - columna 6, línea 50; columna 8, líneas 1-28; columna 10, líneas 9-59; figuras 1-5, 7-9.	1-5, 8-11
A	US 2012078036 A1 (ECOPOR) 29/03/2012, párrafos [31-57]; figuras.	1
A	US 5674178 A (ROOT ROBERT W.) 07/10/1997, Columna 2, líneas 10-27; columna 3, líneas 10-43; figuras.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 26.01.2017</p>	<p>Examinador J. Cuadrado Prados</p>	<p>Página 1/5</p>
---	---	------------------------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61D

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, PAJ

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: **26.01.2017**

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 0149205 A1 (IBERICA DE REPRODUCCION ASISTIDA)	12.07.2001
D02	WO 0152767 A1 (UNIVERSIDAD DE MURCIA)	26.07.2001
D03	ES 2247318T T3 (MINITUBE OF AMERICA INC.)	01.03.2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere a un dispositivo de inseminación artificial intracervical en ganadería porcina, para introducir semen a nivel cervical profundo en cerdas, extendiendo dicho depósito hasta la zona mas craneal del cérvix del útero del animal, alcanzando por tanto mayor profundidad que la inseminación cervical tradicional, y reduciendo las perdidas espermáticas por reflujo a través del dispositivo durante la inseminación, gracias al acoplamiento manual que se produce entre la cánula y el catéter en la parte posterior del dispositivo (**página 1, líneas 7-13**).

La solicitud pretende solucionar alguno de los problemas encontrados en la práctica de la inseminación artificial (IA) post-cervical o intrauterina, técnica de uso habitual en los últimos años, en lugar de la tradicional inseminación artificial a nivel cervical, que ha sido anteriormente la técnica de inseminación más utilizada en la especie porcina. La IA intrauterina se desarrolló con la idea de depositar el semen más cerca del lugar de fecundación de lo que lo hacía la IA cervical, para así reducir el volumen y número de espermatozoides necesarios. Según la solicitud *“el principal problema de la IA post-cervical es que no es posible su aplicación, o es muy limitada, en cerdas jóvenes como son las cerdas nulíparas, por la dificultad en la inserción del catéter de inseminación, sobre todo en la parte mas profunda (parte craneal) del cérvix, lo que impide que el sistema de IA post-cervical se pueda aplicar a este tipo de cerdas con garantías”* (**página 3, líneas 4-23**).

Se busca resolver el problema mediante un dispositivo de IA que *“esta diseñado en base a la morfología y dimensiones específicas del aparato reproductor de la cerda nulípara, que permite la deposición del semen no en la región post-cervical, después del cérvix, debido a su imposibilidad anatómica en atravesarla, sino en la región cervical profunda”*, con lo que *“se consigue reducir el número de espermatozoides a depositar con respecto a la IA cervical convencional”* y donde este dispositivo *“evita la pérdida de fluidos seminales a través del catéter durante la inseminación, por lo que se maximiza el rendimiento”* (**página 3, líneas 26-31, página 4, líneas 15-16**).

Los documentos citados en el Informe (IET) solo muestran el estado general de la técnica y no se consideran de particular relevancia. Así, la invención reivindicada cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva.

Se considera el **documento D01** el estado de la técnica más cercano al objeto técnico definido en la reivindicación principal de la solicitud en estudio, y se refiere a un dispositivo de inseminación artificial en ganado porcino. Este documento D01 comparte muchas de las características técnicas contenidas en el objeto definido por la **reivindicación principal** en estudio, ya que en el mismo se anticipa (**las referencias entre paréntesis se aplican a D01**) un:

- Dispositivo de inseminación artificial en ganadería porcina (**título**), que comprende un catéter tubular (**1**) cuyo extremo posterior incluye un engrosamiento constitutivo de un mango de sujeción (**7**) y en cuya parte anterior presenta una pieza adherida (**2**) que facilita su introducción y fijación en la entrada del conducto cervical (**página 10, líneas 1-3**); y en el que en el interior del catéter (**1**) se ha previsto una cánula hueca (**3**), emergente a través del extremo anterior de dicho catéter (**figuras 1, 3**); dicha cánula (**3**) termina en su extremo anterior en forma de tapón redondeado (**4, 4'**) de diámetro igual o ligeramente superior al diámetro de la cánula (**página 10, líneas 14-16, figuras**) y que presenta un orificio para la salida del semen (**5, 5', figuras 2, 4**).

Aunque en la reivindicación en estudio se indica que el dispositivo *“esta previsto para introducir esperma en la zona craneal del cérvix del útero del animal”*, esto es, para realizar una inseminación intracervical, no se ha tenido en cuenta al realizar el análisis y comparación con el dispositivo del documento D01, previsto para la inseminación intrauterina, ya que no se considera una característica técnica, sino una indicación del modo de uso del dispositivo, que como tal no se considera patentable por tratarse de un método de tratamiento quirúrgico del cuerpo de un animal.

10. Anexo II: Publicaciones derivadas de la tesis

Anexo II: Publicaciones derivadas de la tesis

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se han incluido en las siguientes publicaciones:

Artículos en revistas incluidas en *Science Citation Index (SCI)*:

1. Hernández-Caravaca I, **Llamas-López PJ**, Izquierdo-Rico MJ, Soriano-Úbeda C, Matás C, Gardón JC, García-Vázquez FA. Optimization of post-cervical artificial insemination in gilts: Effect of cervical relaxation procedures and catheter type. *Theriogenology* 2017;90:147-52. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.027>.
2. García-Vázquez FA, **Llamas-López PJ**, Jacome MA, Sarrias-Gil L, López-Albors O. Morphological changes in the porcine cervix: A comparison between nulliparous and multiparous sows with regard to post-cervical artificial insemination. *Theriogenology* 2019;127:120-9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.004>.
3. **Llamas-López PJ**, López-Úbeda R, López G, Antinoja E, García-Vázquez FA. A new device for deep cervical artificial insemination in gilts reduces the number of sperm per dose without impairing final reproductive performance. *J Anim Sci Biotechnol* 2019;10:11. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0313-1>.
4. García-Vázquez FA, Mellagi APG, Ulguim RR, Hernández-Caravaca I, **Llamas-López PJ**, Bortolozzo FP. Post-cervical artificial insemination in porcine: The technique that came to stay. *Theriogenology* 2019;129:37-45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.004>

Artículos de divulgación:

1. García-Vázquez FA, Hernández-Caravaca I, **Llamas-López PJ**. Estado actual de la inseminación post-cervical en cerdas multíparas, primíparas y nulíparas. <https://www.3tres3.com> Sección: Genética y Reproducción. 21-diciembre 2015. https://www.3tres3.com/articulos/estado-actual-de-la-inseminacion-post-cervical-en-cerdas_36016/
2. García-Vázquez FA, Hernández-Caravaca I, **Llamas-López PJ**. Optimización de la inseminación post-cervical en la especie porcina: puntos críticos. <https://www.3tres3.com> Sección: Genética y Reproducción. 16-Febrero 2016. https://www.3tres3.com/los-expertos-opinan/optimizacion-de-la-inseminacion-post-cervical-en-la-especie-porcina-p_36170/
3. García-Vázquez FA, López-Albors O, **Llamas-López PJ**. Avances en la inseminación artificial en cerdas nulíparas. <https://www.3tres3.com> Sección: Genética y Reproducción. 10-diciembre 2018. https://www.3tres3.com/articulos/avances-en-la-inseminacion-artificial-en-cerdas-nuliparas_40187/

Abstracts en revistas incluidas en Science Citation Index (SCI):

1. **Llamas-López PJ**, López-Albors O, Jacome MA, Martínez-Espí M, García-Vázquez FA. Morphometrical study of the lumen of the porcine cervix: nulliparous vs. multiparous. 21nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Bern, 24-26th of August 2017;52(Suppl. 4):105.
2. **Llamas-López PJ**, López-Úbeda R, García-Vázquez FA. New device for deep cervical artificial insemination in gilts. 22nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Córdoba, 27-29th of September 2018. Poster P170. *Reprod Dom Anim.* 2018;53(Suppl. 2):159.
3. López-Albors O, **Llamas-López PJ**, Sarrias-Gil L, García-Vázquez FA. Tissue composition differences in the cranial cervix of nulliparous and multiparous sows. 22nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Cordoba, 27-29th of September 2018. Poster P171. *Reprod Dom Anim.* 2018;53(Suppl. 2):159.

Comunicaciones en congresos:

1. **Llamas-López PJ**, Hernández-Caravaca I, Izquierdo-Rico MJ, Soriano-Úbeda C, Matás C, García-Vázquez FA. Application of post-cervical artificial insemination in gilts. II Jornadas Doctorales UMU. 31 Mayo-2 Junio 2016. ISBN: 978-84-608-9778-1. <http://congresos.um.es/jdoctorado/jdoctorado2016/paper/view/50731/22941>.
2. **Llamas-López PJ**, López-Albors O, Jacome MA, Sarrias-Gil L, García-Vázquez FA. Reconstrucción 3D del cuello uterino de cerdas nulíparas y múltíparas a través de moldes endoluminales. IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia. 29-31 de mayo de 2018.

Ponencias en jornadas/congresos:

1. **Llamas-López PJ**. Avances en el estudio de la inseminación artificial porcina. II Jornadas de Reproducción y Genética Porcina. Costa Rica, 2017.
2. **Llamas-López PJ**. Aplicación de la inseminación post-cervical en porcino. Seminario de Cuestiones Veterinarias en Cerdos y Aves. Moscú, 2017.
3. **Llamas-López PJ**. Centros de inseminación artificial. Diseño, manejo y control de calidad. VI Congreso Iberoamericano de Porcicultura. Panamá, 2019.