

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
USFQ**

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Efecto del Factor estimulante de colonias de
granulocitos recombinante humano (r-met-hu G-CSF)
en el desarrollo testicular de bovinos prepuberales**

Proyecto de Investigación

Darío Israel Arévalo Alvear

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 01 de mayo de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Efecto del Factor estimulante de colonias de granulocitos
recombinante humano (r-met-hu G-CSF) en el desarrollo testicular de
bovinos prepuberales**

Darío Israel Arévalo Alvear

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico:

Pedro Manuel Aponte García, Ph.D.

Firma del profesor:

Quito, 01 de mayo de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Darío Israel Arévalo Alvear

Código: 00121484

Cédula de Identidad: 172230437-3

Lugar y fecha: Quito, 01 de mayo de 2019

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por estar siempre conmigo, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas.

A mi madre querida, por ser el pilar más importante y por demostrarme su cariño y apoyo incondicional en las buenas y en las malas.

A mi padre, por su amor, paciencia y esfuerzo, y por inculcar en mi el ejemplo de trabajo y valentía.

A mis hermanos, por todos los consejos brindados y por llenarme de alegrías día tras día.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiarme y acompañarme en el transcurso de mi vida.

A mis padres por su apoyo incondicional.

A mi familia entera por su cariño, consejos, confianza y por todo lo que me han dado a lo largo de mi carrera y mi vida.

A mi director de tesis Dr. Pedro Aponte quien con su experiencia, conocimiento y motivación me orientó en la investigación.

RESUMEN

La presente investigación busca evaluar los efectos de la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim) como inductor en el desarrollo sexual de bovinos prepuberales y su impacto en la función reproductiva. Se utilizaron 12 toretes de raza Brahman (edad: 9 meses; \bar{x} = 239 kg p.v.) divididos en 4 grupos: control inicial (T0; n=2); control (T1; n=3) y 2 grupos tratados (T2; n=4) y (T3; n=3), con dosis diaria vía SC de Filgrastim (4 días) [(T2; 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.) y (T3; 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.)]. Se realizó un análisis hematológico (serie blanca) para determinar la respuesta de la médula ósea (hematopoyética) del filgrastim. Se evaluó el peso, morfometría y volumen testicular, así como la histología del ciclo espermatogénico. No se encontraron diferencias significativas en las cantidades de leucocitos entre T1, T2 y T3 ($p > 0,05$) durante los 60 días de tratamiento. Sin embargo, durante los primeros días de tratamiento hubo un aumento significativo de eosinófilos y basófilos en relación al control ($p < 0,05$). T2 presentó un perfil celular germinal más avanzado al final de los experimentos (espermátidas elongadas) respecto al resto de grupos, mientras que T3 alcanzó la generación de espermátidas redondas. No se encontraron diferencias significativas ni en el peso, ni en el volumen testicular entre T1, T2 y T3 ($p > 0,05$). Asimismo, el peso corporal y la circunferencia escrotal permanecieron constantes independientemente del tratamiento ($p > 0,05$). Por otra parte, se encontraron diferencias significativas en el número de espermatozoides producidos diariamente por gramo de parénquima testicular (eficiencia espermatogénica) entre T1 y T2 ($p < 0,05$). En conclusión, el aumento de la eficiencia espermatogénica en los animales tratados con filgrastim a los 60 días de tratamiento implica un posible efecto de aceleración de la espermatogénesis en animales prepuberales que deberá ser explorado más detalladamente y lo sitúa potencialmente como un factor estimulante del desarrollo sexual.

Palabras clave: r-met-hu G-CSF (Filgrastim), análisis hematológico, hematopoyesis, análisis histológico, desarrollo sexual, bovino.

ABSTRACT

This research seeks to evaluate the effects of the application of r-met-hu G-CSF (Filgrastim) as an inducer in the sexual development of prepubertal bovines and its impact on reproductive function. Twelve Brahman bulls were used (age: 9 months; \bar{x} = 239 kg b.w.) divided into 4 groups: initial control (T0; n=2); control (T1; n=3) and 2 treated groups (T2; n=4) and (T3; n=3), with Filgrastim daily doses via SC (4 days) [(T2; 1 μ g/kg p.v.) and (T3; 4 μ g/kg p.v.)]. A hematological analysis (white series) was performed to determine the response of the bone marrow (hematopoietic) to filgrastim. Weight, morphometry and testicular volume were evaluated, as well as the histology of the spermatogenic cycle. No significant differences in leukocyte amounts were found between T1, T2 and T3 ($p > 0.05$) during the 60 days of treatment. However, during the first days of treatment there was a significant increase of eosinophils and basophils in relation to control ($p < 0.05$). T2 presented a more advanced germ cell profile (elongated spermatids) than the rest of the groups at day 60, while T3 reached the generation of round spermatids. No significant differences in weight or testicular volume were found between T1, T2 and T3 ($p > 0.05$). Likewise, body weight and scrotal circumference remained constant regardless of treatment ($p > 0.05$). On the other hand, significant differences were found in the number of sperm produced daily per gram of testicular parenchyma (spermatogenic efficiency) between T1 and T2 ($p < 0.05$). In conclusion, the increase in spermatogenic efficiency in animals treated with filgrastim detected at 60 days of treatment implies a possible effect of acceleration of spermatogenesis in prepubertal animals that should be explored in more detail and makes it potential factor for sexual development stimulation.

Keywords: r-met-hu G-CSF (Filgrastim), hematological analysis, hematopoiesis, histological analysis, sexual development, bovine.

Tabla de contenido

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN: | 10 |
| 1.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO EN BOVINOS | 10 |
| 1.2. ESPERMATOGÉNESIS BOVINA | 12 |
| 1.2.1 ESPERMATOCITOGÉNESIS: | 13 |
| 1.2.2 MEIOSIS: | 14 |
| 1.2.3 ESPERMIOGENESIS | 15 |
| 1.3. GANADO BRAHMAN | 15 |
| 1.4. DESARROLLO SEXUAL | 16 |
| 1.5. FILGRASTIM | 17 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 18 |
| 3. ÁREA DE ESTUDIO | 19 |
| 4. MATERIALES: | 20 |
| 4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL: | 20 |
| 4.2 CASTRACIÓN: | 20 |
| 4.3 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL: | 21 |
| 4.4 ANÁLISIS MORFOLÓGICO: | 21 |
| 4.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO: | 21 |
| 4.6 ANALISIS HEMATOLÓGICO: | 22 |
| 4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO: | 22 |
| 5. MÉTODOS: | 22 |
| 5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL | 22 |
| 5.2 CASTRACIÓN | 23 |
| 5.3 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL | 24 |
| 5.4 ANÁLISIS MORFOLÓGICO | 24 |
| 5.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO | 24 |
| 5.6 ANÁLISIS HEMATOLÓGICO | 26 |
| 5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 26 |
| 6. RESULTADOS: | 26 |
| 6.1 ANÁLISIS HEMATOLÓGICOS | 26 |
| 6.1.1 LINFOCITOS | 27 |
| 6.1.2 MONOCITOS | 27 |
| 6.1.3 NEUTRÓFILOS | 27 |
| 6.1.4 EOSINÓFILOS | 28 |
| 6.1.5 BASÓFILOS | 28 |
| 6.2 ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS | 28 |
| 6.2.1 PESO CORPORAL | 29 |
| 6.2.2 CIRCUNFERENCIA ESCROTAL | 29 |
| 6.2.3 PESO TESTICULAR | 29 |
| 6.2.4 VOLUMEN TESTICULAR | 29 |
| 6.3 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS | 30 |
| 6.3.1 NÚMERO DE ESPERMÁTIDAS | 30 |
| 6.3.2 DAILY SPERM PRODUCTION (DSP) | 31 |
| 6.3.3 DAILY SPERM PRODUCTION (DSP)/TORO | 31 |
| 6.3.4 DAILY SPERM PRODUCTION (DSP)/GR. | 31 |
| 6.4 ALTERACIONES HISTOLÓGICAS | 32 |
| 7. DISCUSIÓN | 32 |

| | |
|-------------------------|----|
| 8. CONCLUSIONES..... | 37 |
| 9. RECOMENDACIONES..... | 38 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA..... | 39 |
| 11. TABLAS..... | 46 |
| 12. FIGURAS..... | 47 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Resumen de los tratamientos realizados..... | 46 |
|---|----|

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Cantidad de linfocitos tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 47 |
| Figura 2. Cantidad de monocitos tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 48 |
| Figura 3. Cantidad de neutrófilos tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 49 |
| Figura 4. Cantidad de eosinófilos tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 50 |
| Figura 5. Cantidad de basófilos tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 51 |
| Figura 6. Peso corporal tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 52 |
| Figura 7. Circunferencia escrotal tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 53 |
| Figura 8. Peso testicular (gr) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 54 |
| Figura 9. Volumen testicular (ml) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 55 |
| Figura 10. Número de espermátidas (x106) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 56 |
| Figura 11. Daily sperm production (DSP) (x106) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 57 |
| Figura 12. Daily sperm production (DSP)/toro (x106) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 58 |
| Figura 13. Daily sperm production (DSP)/gr (x106) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones..... | 59 |
| Figura 14. Estado de Desarrollo de la espermatogénesis..... | 60 |

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO EN BOVINOS

El aparato reproductor del macho bovino se encuentra situado en el interior de la cavidad abdominal, justo debajo del recto; y cuenta con las siguientes estructuras anatómicas: testículos, epidídimos, uretra, conductos deferentes, ampollas deferentes, glándulas accesorias (próstata, glándulas vesiculares y glándulas bulbouretrales), pene y prepucio. (Rangel, Alarcón, & Galina, 2009).

Los testículos son las gónadas sexuales masculinas. Su función es la producción de espermatozoides y generar la hormona testosterona, la cual determina el desarrollo y mantenimiento de las reacciones sexuales, así como la aparición de los caracteres sexuales secundarios (JICA, 2016). Están situados fuera del abdomen, de forma vertical dentro del escroto. Son dos estructuras grandes ovaladas y colgantes que pueden llegar a medir 13 cm. De longitud o más (Loayza, 2009). Cada gónada está rodeada de dentro hacia fuera por una túnica albugínea, una túnica vaginal, una túnica dartos y el escroto. Por su parte, existe el parénquima testicular, el cual está formado por los túbulos seminíferos (sitio de producción de espermatozoides), y tejido intersticial compuesto por vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Gnemmi & Lefebvre, 2009). Una vez producidos los espermatozoides, estos son colectados por la rete testis, y enviados a los conductos eferentes, los cuales desembocan en la cabeza del epidídimo (Rangel, Alarcón, & Galina, 2009).

El epidídimo constituye una estructura en forma de ducto, adyacente al testículo. Sus funciones son el transporte, maduración y almacenamiento de los espermatozoides (Nichi et al., 2017). Anatómicamente se divide en tres partes: cabeza, cuerpo y cola. Ésta última parte se conecta con los conductos deferentes, los cuales

almacenan y transportan el semen hacia la uretra durante la eyaculación. La parte terminal de los conductos deferentes se denominan ámpulas (JICA, 2016).

Las glándulas accesorias producen el líquido seminal, que servirá para conservar y movilizar los espermatozoides. Además, este líquido aporta volumen, nutrientes y protección al semen (Desnoyers, Théarien, & Manjunath, 1994). La próstata es una protuberancia transversal situada cerca de la vejiga y la uretra. Posee dos porciones, un cuerpo y una porción diseminada. Su función es producir líquidos alcalinos para neutralizar la condición ácida de la uretra y de la vejiga (Hiramatsu, Yoshida, & Koda, 1975). Las glándulas bulbouretrales se localizan a ambos lados de la uretra, y su función es similar a la de la próstata. Es decir, fabricar líquidos seminales (Bruss, Schuppe, & Schill, 2004)

Las vesículas seminales son dos y se ubican a ambos lados de la vejiga. Miden entre 8 a 10 cm., y secretan un líquido rico en fructosa y ácido cítrico (Gnemmi & Lefebvre, 2009).

El pene es el órgano de la copulación, y tiene dos funciones: la expulsión de la orina y el depósito del semen en el aparato reproductor de la hembra. Se reconocen tres partes: la base, el cuerpo y el glande, de las cuales el cuerpo es la parte más grande (Rangel, Alarcón, & Galina, 2009). El pene de los mamíferos está estructurado por capas de tejido eréctil denominadas cuerpos cavernosos y esponjosos, los cuales rodean a la uretra. En el caso de la erección, estas estructuras se llenan de sangre. Sin embargo, los rumiantes al poseer un pene fibro elástico, sus cuerpos cavernosos son menos desarrollados, y poseen una flexura sigmoidea o “S” peneana (JICA, 2016). Por último, el prepucio constituye una porción de tejido epitelial y mucosa que cubre el pene flácido y lo protege (Rangel, Alarcón, & Galina, 2009).

1.2. ESPERMATOGÉNESIS BOVINA

La espermatogénesis es un proceso dinámico y complejo que comprende la división y diferenciación del epitelio germinal del testículo. De esta manera a partir de células madre espermatogoniales (SSCs) se obtienen como resultado células denominadas espermatozoides (Kim, Kim, & Kim, 2015). Todo el proceso ocurre dentro del testículo, y comprende tres fases principales de estudio en animales adultos que son: espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis (Aponte, 2001).

El desarrollo de las espermatogonias ocurre antes de comenzar el proceso de espermatogénesis. Precisamente es en el periodo fetal del animal cuando las gónadas comienzan a diferenciarse y se asientan las células germinales primordiales. Éstas células migran desde el saco vitelino hasta llegar a las gónadas a través del mesenterio (Phillips, Gassei, & Orwing, 2010). Se cree que los mecanismos de migración están basados en movimientos ameboides de las células. Una vez establecidas las células germinales primordiales en la gónada indiferenciada, estas comienzan a dividirse por mitosis incrementando su número rápidamente. De esta manera, forman los cordones sexuales junto a un conjunto de células derivadas del epitelio celómico, que constituyen las futuras células de Sertoli. A futuro los cordones sexuales se convertirán en los túbulos seminíferos. A este nivel las células germinales primordiales pasan a ser gonocitos (Oatley et al., 2004).

A la edad de 8 semanas en el bovino *Bos taurus* los gonocitos proliferan por mitosis durante los siguientes días, y quedan arrestados en la fase G_0/G_1 del ciclo celular. De aquí continúa su proliferación generando las espermatogonias tipo A, las cuales se localizan en la base del tubo seminífero en animales adultos (Aponte, 2001). El ciclo de la espermatogénesis en el toro adulto dura aproximadamente 61 días (Staub & Johnson, 2018).

1.2.1 ESPERMATOCITOGÉNESIS:

La espermatocitogénesis constituye el proceso de diferenciación y renovación de espermatogonias mediante actividad mitótica cíclica (Jiménez, 2013). Las espermatogonias que siguen el camino de la diferenciación producen espermatocitos, mientras que aquellas que siguen la vía de renovación proliferan con el fin de asegurar suficientes células germinales durante las etapas reproductivas (Aponte, 2001). El modelo más aceptado sugiere que la mitad de espermatogonias sigue la vía de la diferenciación, mientras que la otra mitad sigue la línea de renovación durante estas etapas, es decir, durante el funcionamiento normal del órgano (Martins et al., 2015).

En el proceso de diferenciación, existen tres tipos de espermatogonias descritos en varias especies de mamíferos: Las espermatogonias A (A_1 A_2 A_3 A_4), las intermedias (In) y las B. Las espermatogonias que se dividen para diferenciarse se mantienen conectadas formando clones, de esta manera el clon de dos espermatogonias A se denominará A pareadas ó A_{pr} . (Olivera et al., 2006). De aquí en adelante el clon se denominará según el número de células ó también A alineadas ó A_{al} . Este último tipo de espermatogonias queda arrestado en la fase G_1 por un corto tiempo. Después ocurre su división donde generan las espermatogonias A_1 que constituyen la primera generación de espermatogonias diferenciadas. De aquí en adelante el proceso de diferenciación es irreversible (Cuaran & Burbano, 2014). De esta manera la dinámica de divisiones mitóticas que permiten la formación de espermatocitos queda establecido de la siguiente manera:

$A \rightarrow A_{pr} \rightarrow A_{al} \rightarrow A_1 \rightarrow A_2 \rightarrow A_3 \rightarrow A_4 \rightarrow In \rightarrow B \rightarrow$ Espermatoцитos primarios (Preleptoteno, Leptoteno, Cigoteno, Paquiteno y Diploteno) (Aponte, 2001).

Durante todo el proceso de espermatogénesis incluyendo la espermatocitogénesis ocurre un proceso de muerte celular genéticamente controlado denominado por algunos autores degeneración o apoptosis. Este proceso permite controlar y uniformizar las poblaciones celulares, principalmente de espermatogonias A comprometidas en el proceso de diferenciación a lo largo del túbulo seminífero en animales prepuberales (Aponte, 2001). Por otra parte, el proceso de apoptosis también permite eliminar espermatogonias dañadas por radiación o uso de drogas (Shukla et al., 2012).

1.2.2 MEIOSIS:

La meiosis es un proceso de división celular, ligado a la gametogénesis en eucariotas superiores, cuya finalidad es la reducción e intercambio genético entre cromosomas homólogos, con el fin de generar espermátidas haploides (n) a partir de espermátocitos diploides ($2n$) (Alemany, 2017). Esto se logra a través de dos divisiones celulares consecutivas (I y II). Previo a la primera meiosis, el espermátocito primario duplica su ADN sin que ocurra división celular, y se denomina espermátocito primario en fase de preleptoteno. De esta manera poseerá doble carga cromosómica ($2n$) y cuádruple carga de ADN ($4c$) (Griswold, 2015).

La primera meiosis presenta cuatro fases: profase I, metafase I, anafase I y telofase I. de las cuales la profase I constituye la fase más prolongada y significativa de la meiosis (Johnson, 1995). Dura alrededor de tres semanas y se caracteriza por que los cromosomas homólogos efectúan la recombinación meiótica (crossingover), manteniéndose unidos a través del complejo sinaptonemal. Esta fase se divide a su vez, en cuatro sub-fases o configuraciones dependiendo de la estructura de la cromatina: leptoteno, cigoteno, paquiteno y diacinesis (Alemany, 2017). Siguiendo el proceso, en

la metafase I los cromosomas maternos y paternos recombinados se ubican al azar a cada lado del ecuador. En la anafase I, los cromosomas migran hacia los centriolos del espermatocito I. Al finalizar este primer ciclo, en la telofase I, la membrana nuclear se reconstituye envolviendo a los cromosomas y dando lugar a los núcleos de los espermatocitos secundarios. Estos últimos ingresarán a la segunda división meiótica (Aponte, 2001).

En la segunda división meiótica ocurre la división reduccional. Esta transcurre muy rápidamente. El centrómero, unido a cada par de cromátidas hermanas de cada cromosoma se divide. Esto ocurre en la metafase II. En la anafase II se da la separación espacial de los cromosomas, mientras que al finalizar la telofase II, el espermatocito primario diploide ($2n$) y con cuatriple carga de ADN ($4c$), ha generado cuatro células haploides ($1n$) con una sola carga de ADN ($1c$), a las cuales se denomina espermátidas (Málaga et al., 2005).

1.2.3 ESPERMIOGENESIS

La espermiogenesis es el proceso de maduración de las espermátidas hasta convertirse en espermatozoides, siendo liberados desde las células de Sertoli hacia la luz del túbulo seminífero (Aponte, 2001). La forma esférica de las espermátidas sufre una transformación que consta de tres fases: reorganización nuclear, sistema acrosómico y formación del flagelo (Marina, 2003).

1.3. GANADO BRAHMAN

El hato bovino ecuatoriano está compuesto por 4`180.000 cabezas de ganado (ESPAC, 2017), de las cuales un 19,2% se clasifica como ganado de carne (Acebo,

2016). En los sistemas de producción de carne del Ecuador, el tipo racial predominante es el cebú y la raza más habitual es la Brahman (Vela, 2016). De hecho, en el último censo agropecuario nacional se contabilizaron 642.000 animales clasificados como Brahman o cebú (ESPAC, 2017).

El ganado Brahman fue creado en los Estados Unidos a finales del siglo XIX mediante el uso y cruzamiento de cuatro razas *Bos indicus* provenientes de la India (Guzerat, Nelore, Gyr y Krishna Valley) (Riquelme, 2015). Los estadounidenses desarrollaron una selección rígida y cuidadosa basados en la producción eficiente de carne para la mayoría de climas. Actualmente la raza Brahman se encuentra dispersa en más de 60 países alrededor del mundo, principalmente en climas tropicales y sub tropicales. El ganado Brahman ha sido mundialmente reconocido por su rápido desarrollo y crecimiento; así como por su rusticidad, resistencia y capacidad de alimentación (Gonzalez, 2019).

1.4. DESARROLLO SEXUAL

La pubertad se conoce como el proceso de adquisición de la fertilidad, en el cual inician las funciones neuroendócrinas en el sistema hipotálamo-hipofisiario. Ocurre un aumento del nivel de las hormonas gonadotróficas en la hipófisis y en la sangre, elevando los niveles de testosterona y permitiendo, en los animales machos, la formación de los espermatozoides (espermatogénesis) (Ladino & Navarro, 2017). Con estos cambios el toro desarrolla sus órganos sexuales funcionalmente, presenta un instinto sexual prominente y su reproducción es posible. Sin embargo, el alcance de la pubertad no asegura una capacidad reproductiva completa, ya que existen diferencias entre la edad puberal y la edad de madurez sexual. En términos generales, las razas *Bos indicus* alcanzan la pubertad a edades mayores que las razas *Bos taurus* (Aponte, Rooji,

& Bastidas, 2005). El ganado Brahman no es la excepción y varios estudios reportan que alcanzan la pubertad entre los 10 y 14,6 meses de edad (Bastidas, 1999). Otros estudios indican que la edad de pubertad para toros cebuinos en el trópico se da entre los 13 y 21 meses de edad (Espitia, Prieto, & Cardozo, 2006). Por su parte, la edad peripuberal en la mayoría de bovinos aparece entre los 7 y 9 meses de edad, considerando que existen ligeros rangos según la raza, medio y manejo (Revelo, 2016).

1.5. FILGRASTIM

El Filgrastim es un medicamento cuyo principio activo es el factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante humano (rG-CSF), el cual se produce mediante la tecnología del ADN recombinante. El rG-CSF constituye una hormona glicoproteica producida a gran escala por medio de *E. coli*, a la cual se le ha insertado el gen humano que codifica dicha proteína (Catalán et al., 1992). El resultado es una proteína idéntica a la proteína humana con la excepción de presentar una metionina en el extremo aminoterminal, lo cual se justifica debido a su necesidad para su expresión; además de no glicolisarse secundariamente (IQB, 2014). El mecanismo de acción de este factor de crecimiento consiste en regular la producción y liberación de neutrófilos activos desde la médula ósea, generando un aumento significativo de éstos en la sangre periférica, como respuesta a las necesidades de defensa del huésped (IQB, 2014). Es utilizado clínicamente en pacientes oncológicos y en aquellos que han experimentado trasplante de médula para tratar la neutropenia inducida por la quimioterapia, y disminuir de esta manera, la incidencia de infecciones (Catalán et al., 1992).

Por otra parte, estudios recientes demuestran la expresión del rG-CSF en células fuera del sistema hematopoyético. Un ejemplo es la expresión del rG-CSF en células gliales durante el desarrollo neural, mostrando beneficios terapéuticos en el

tejido neural. Asimismo, se ha identificado beneficios en cardiomiocitos mediante la estimulación y proliferación de estas células durante el desarrollo de ratones (Wright, Ward, & Russel, 2017). En otra investigación se ha encontrado que el rG-CSF es fundamental para la regeneración muscular a largo plazo y el mantenimiento funcional del tejido muscular en modelos de ratones con distrofia muscular de Duchenne (DMD) (Shinsuke et al., 2015). Esto simplemente indica que el papel de aplicación del rG-CSF es mucho más amplio y prometedor; y mucho más para la industria animal, donde el uso del rG-CSF constituye un completo reto debido a los escasos estudios y efectos de este factor en tejido no hematopoyético de especies domesticas productivas. Es necesario estudiar el papel fisiológico del rG-CSF en la proliferación y diferenciación de otro tipo de tejidos como lo es el tejido testicular, lo cual abriría nuevos caminos y proyecciones para el aumento de beneficios en la industria animal (Gutierrez et al., 2017).

2. JUSTIFICACIÓN

El sector agropecuario ha desempeñado un rol esencial en el desarrollo de la humanidad y se percibe que a futuro su participación podría incrementarse debido a la creciente demanda y consumo de productos de origen animal (FAO, 2014). Concretamente, la ganadería bovina en el Ecuador ha constituido una de las principales actividades del sector agropecuario, y ha contribuido una amplia oferta de productos cárnicos y lácteos para el país (Flores, 2012). Por otra parte, se estima que a futuro ocurra una denominada revolución ganadera, lo cual justificaría la recuperación del hato ganadero con mejoras genéticas y fenotípicas (Silva, 2018).

Ante este panorama es fundamental para investigadores y productores llevar un control de la actividad reproductiva de los sementales, y justamente la aceleración del desarrollo sexual puede ser una herramienta elemental para observar los resultados

genéticos de manera temprana. Esto representaría un gran logro desde el punto de vista económico y genético ya que permitiría aumentar la vida productiva de los animales, lograr una selección y mejora genética más temprana, todo lo cual aumentaría las ganancias y disminuiría costos de manutención de los sementales, debido a la reducción de los intervalos de tiempo inter-generacionales. Por otra parte se generarían ventajas de la aceleración del desarrollo sexual en machos jóvenes como la facilidad de manejo, la estimulación, mejor condición corporal y mayor líbido en comparación con machos adultos (Gutierrez et al., 2017).

El uso de factores de crecimiento hematopoyéticos como el r-met-hu G-CSF comercialmente conocido como Filgrastim representa una opción para acelerar el desarrollo sexual en bovinos machos debido a que, a pesar de que se desconoce el papel fisiológico del mismo en otros tejidos no hematopoyéticos, existen reportes de su efecto en el tejido testicular. Ya se han realizado estudios del efecto estimulante de G-CSF en varias especies domésticas como porcinos, ovinos y equinos (Gutierrez et al., 2017). Por tal motivo la presente investigación busca evaluar los efectos de la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim) en el desarrollo sexual de bovinos prepuberales y su impacto en la función reproductiva, mediante el estudio histológico del ciclo espermatogénico y la monitorización de la morfometría testicular y los perfiles hematológicos.

3. ÁREA DE ESTUDIO

Se obtuvieron muestras de sangre y testiculares de toros prepuberales de la raza Brahman pertenecientes a la Hacienda "Emilia" ubicada en el kilómetro 118 de la vía Calacalí-Río Blanco en el cantón Pedro Vicente Maldonado, provincia de Pichincha, Ecuador. Las castraciones y toma de muestras, así como el muestreo sanguíneo se

realizarón en los predios de la hacienda siguiendo los respectivos protocolos bioéticos y veterinarios. Los cortes histológicos de las muestras testiculares se realizaron en el laboratorio de Patología del área de Sanidad Animal de Agrocalidad, ubicado en Tumbaco.

Por su parte, los protocolos de criopreservación, análisis hematológicos, morfológicos e histológicos se realizaron en el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad San Francisco de Quito, USFQ, campus Cumbayá.

4. MATERIALES:

4.1 Diseño Experimental:

- 12 toros raza Brahman de 9 meses de edad.
- Fierros de marcación con número.
- Jeringas.
- Cabos.
- Baldes.

4.2 Castración:

- 12 pares de testículos.
- Bisturí.
- Pinzas.
- Tijeras.
- Hilo de sutura.
- Solución de yodo.

- Lidocaína.
- Spray cicatrizante.

4.3 Recolección y Procesamiento del material:

- Bisturí.
- Balanza.
- Cámara fotográfica.
- Solución de formaldehído 4%.
- Solución etanol 70%.
- Tubos Falcon.

4.4 Análisis Morfológico:

- Cinta de pesaje bovino.
- Cinta métrica.

4.5 Análisis Histológico:

- Tubos Falcon.
- Solución de Bouin:
 - 70% Ácido pícrico saturado.
 - 25% Formaldehído.
 - 5% Ácido acético glacial.
- Etanol 70%, 95% y 100%.
- Xilol.
- Paraplast.
- Moldes para inclusión en parafina.

- Casetes histológicos.
- Micrótopo.
- Baño de flotación.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Alcohol ácido:
 - 70% Etanol absoluto.
 - 5% 1N Ácido clorhídrico (HCl).
- Polilisina (1:100).
- Hematoxilina de Harris.
- Medio de montaje.

4.6 Análisis Hematológico:

- Jeringas.
- Portaobjetos y cubreobjetos.

4.7 Análisis estadístico:

- Software estadístico.

5. MÉTODOS:

5.1 Diseño experimental

Se utilizaron 12 toros de la raza Brahman (edad: 9 meses; Promedio = 239 kg p.v.). Antes de iniciar el estudio, los animales fueron sometidos a exhaustivos controles sanitarios con el fin de verificar la ausencia de cualquier tipo de patología. Posterior a esto los animales fueron ubicados en un área de 15 hectáreas divididos en potreros de 3000 metros cuadrados. Para su alimentación se utilizó la gramínea *Brachiaria*

brizantha cultivar Xaraés, así como sal mineral y otros suplementos alimenticios como palmiste y melaza. Los animales fueron identificados aleatoriamente con un número marcado en la mejilla usando un fierro caliente. A continuación, los animales fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos. El primero (n=2) fue el grupo de los toros castrados al inicio del estudio con el fin de tener una referencia anatómica y fisiológica inicial de los testículos de los toros. El segundo grupo (n=3) fue el grupo control, al cual se inyectó 1 ml Sol. Salina 0,9%. El tercer grupo (n=4) fue el grupo dosis normal al cual se aplicó una dosis de Filgrastim (r-met-hu G-CSF) en proporción 1 ug/ Kg p.v. El último grupo fue el grupo dosis alta (n=3) al cual se aplicó la dosis de Filgrastim de 4 ug/ Kg p.v. Las dosis en todos los grupos fueron aplicadas diariamente por 4 días consecutivos por vía subcutánea.

5.2 Castración

Todos los toros fueron esterilizados por castración quirúrgica independientemente del grupo al que pertenecían. Los dos toros del grupo inicial fueron castrados al inicio del estudio con el fin de obtener las muestras testiculares y tener una referencia del estado reproductivo del grupo de animales. Los toros de los grupos restantes fueron castrados a los 60 días después de la última aplicación del r-met-hu G-CSF.

Para la castración, se inyectó 2 ml. de lidocaína en la zona de incisión testicular y en varios puntos, concéntricamente al cordón testicular con el fin de anestésarla. Con un bisturí, se procedió a hacer un corte de 2 cm. de longitud en el escroto, en su aspecto ventral. Se exteriorizaron los testículos y se cortó el cordón espermático, previa sutura por transfixión en “ocho”. Se roció la zona con spray cicatrizante.

5.3 Recolección y procesamiento del material

Se recolectaron doce pares de testículos, los cuales fueron pesados y fotografiados inicialmente. Después, con un bisturí, se tomó una muestra de 1 cm³ aprox. de cada testículo por cada toro. Se realizó un corte de tejido testicular de una zona cerca del polo caudal del testículo. Las muestras fueron fijadas en solución de Bouin durante 24h para finalmente ser transportadas y almacenadas en etanol al 70% (4°C) en el laboratorio de biotecnología Animal de la USFQ hasta su procesamiento histológico.

5.4 Análisis morfológico

Se evaluó el peso y la circunferencia escrotal de todos los toros independientemente del grupo al que pertenecían. Las mediciones se realizaron una vez al mes durante 4 meses (Jun-Jul-Ago-Sep). Para el pesaje de los animales se utilizó una cinta de pesaje bovino, mientras que, para la medición de la circunferencia escrotal, se utilizó una cinta métrica.

5.5 Análisis Histológico

Para la inclusión en parafina se tomaron las muestras previamente fijadas del tejido testicular de cada toro, las cuales fueron procesadas mediante una serie de pasos de deshidratación en alcoholes y otros pasos de dilución en parafina. El protocolo de deshidratación consistió en lo siguiente: etanol al 70% por 15 minutos (2 veces), etanol al 95% por 40 minutos (1 vez), etanol al 100% por 20 minutos (3 veces), xilol por 10 minutos, xilol por 5 minutos (2 veces), xilol: Paraplast (1:1) por 45 minutos, xilol: Paraplast (1:2) por 45 minutos, y Paraplast por 1 hora (2 veces). Finalmente, las

muestras fueron infiltradas en parafina, utilizando para su soporte casetes histológicos, conformando bloques, los cuales se almacenaron a 4°C hasta la realización de los cortes.

Se realizó cortes pareados consecutivos de 5 μm . de espesor utilizando un micrótopo. Los cortes de tejido fueron colocados en un baño de flotación a 40°C, para luego ser recolectados con un portaobjetos limpio previamente recubiertos con polilisina en agua destilada (1:10).

Para la colocación de las láminas histológicas, primero se removió la parafina de la muestra de los portaobjetos (xilol). Se realizó otro lavado con alcoholes seriados en concentraciones decrecientes. El protocolo fue el siguiente: xilol por 3 minutos (3 veces), etanol 100% por 1 minuto y etanol 95% por 1 minuto. Se rehidrató el tejido con agua destilada por 3 minutos (2 veces), y posteriormente se realizó una tinción con hematoxilina de Harris durante 15 segundos exponiendo el tejido testicular al colorante. Se lavó el excedente de las láminas con agua destilada y se mantuvieron en agua corriente (bajo un chorro pequeño) durante 10 minutos para lograr la diferenciación del colorante. A continuación, las placas fueron deshidratadas nuevamente con etanol 95% por 1 minuto (2 veces), etanol 100% por 1 minuto (2 veces) y xilol por 1 minuto (3 veces). Después, se colocó dos gotas de medio de montaje sobre las muestras de tejido testicular en el portaobjetos, y se cubrió cuidadosamente con el cubreobjetos. Se dejó reposar las láminas durante 24 horas. Finalmente se observó la morfología de los tejidos y estado de la espermatogénesis por microscopía óptica a magnificaciones 10x y 40x.

5.6 Análisis Hematológico

Se obtuvieron muestras de sangre de diez de los doce toros (sin contar los que se castraron inicialmente). Las muestras se tomaron durante los 4 días de tratamiento y una muestra final al día 60. Las muestras se obtuvieron de la vena coccígea usando una aguja 18Gx y tubos de recolección con EDTA 7,2 mg. Una vez obtenida la muestra en el tubo de ensayo, ésta fue identificada. Se realizó un frotis depositando una gota de sangre, obtenida sin coagulante en un portaobjetos y corriendo la muestra con otro portaobjetos. A continuación, se fijaron los frotis con etanol 95% por 10 min y se tiñeron con Giemsa al 6% en agua destilada por 12 horas.

5.7 Análisis estadístico

Se determinaron las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes tratamientos aplicados considerando los resultados del análisis histológico, hematológico y morfológico, utilizando ANOVA y al detectarse resultados significativos, se realizó una comparación de medias a través de la prueba de Bonferroni.

6. RESULTADOS:

6.1 Análisis Hematológicos

A partir de las muestras de sangre obtenidas y los frotis realizados, se analizaron los datos para determinar diferencias significativas en varios parámetros hematológicos de la serie blanca. Se comparó la cantidad de los diferentes tipos celulares de glóbulos blancos bajo los tres tratamientos implementados a lo largo del tiempo. Los tres tratamientos son el grupo control (T1), el grupo dosis normal (T2) y el grupo dosis alta

(T3), y corresponden a diferentes grupos de toros a los cuales se les inyectó diferentes dosis de filgrastim.

6.1.1 Linfocitos

Como se observa en la figura 1, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de linfocitos entre T1, T2 y T3 ($p > 0,05$). Sólo en el día 1 se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de linfocitos entre los tres tratamientos ($p < 0,05$). (T1) fue mayor que (T2) y (T3). T1= $54,1\% \pm 3,0$; T2= $45,3\% \pm 2,21$; T3= $32,2\% \pm 6,1$.

6.1.2 Monocitos

No existieron cambios significativos en la cantidad de monocitos entre T1, T2 y T3. En la figura 2 se observa que no existieron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de monocitos entre T1, T2 y T3 a lo largo de los 60 días de tratamiento ($p > 0,05$). Salvo en el día 1 se encontró diferencias significativas entre el grupo dosis normal (T2) y el resto de grupos ($p < 0,05$). (T2) fue menor que (T3) y (T1). T2= $1,48\% \pm 0,74$; T3= $4,56\% \pm 1,48$; T1= $6,07\% \pm 0,67$

6.1.3 Neutrófilos

No se encontraron cambios estadísticamente significativos en la cantidad de neutrófilos entre T1, T2 y T3. En la figura 3 se observa que no existieron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de neutrófilos entre T1, T2 y T3 a lo largo de los 60 días de tratamiento ($p > 0,05$). Salvo en el día 60, cuando se encontró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control (T1) y el grupo dosis

normal (T2), así como con el grupo dosis alta (T3) ($p < 0,05$). (T1) fue mayor que (T2) y (T3). $T1= 40,3\% \pm 7,47$; $T2= 17,0\% \pm 4,75$; $T3= 16,2\% \pm 0,85$.

6.1.4 Eosinófilos

Respecto al porcentaje de eosinófilos, no se encontraron cambios estadísticamente significativos entre T1, T2 y T3 a lo largo del tiempo. En la figura 4 se observa que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Sólo en el día 3 hubo diferencias estadísticamente significativas en (T1) con respecto al resto de grupos ($p < 0,05$). (T1) fue menor que (T2) y (T3). $T1= 11,5\% \pm 1,10$; $T2= 19,2\% \pm 5,27$; $T3= 20\% \pm 4,61$.

6.1.5 Basófilos

Como se observa en la figura 5, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de Basófilos entre T1, T2 y T3 ($p > 0,05$). La cantidad de basófilos no cambió significativamente a lo largo de los 60 días bajo ninguno de los tratamientos.

6.2 Análisis morfométricos

A partir de las medidas de peso corporal y circunferencia testicular obtenidas, se analizaron los datos para determinar diferencias significativas en parámetros morfométricos. Se comparó las medias de peso corporal y de circunferencia testicular bajo los cuatro tratamientos implementados a lo largo del tiempo. Los cuatro tratamientos son el grupo control inicial (T0), el grupo control (T1), el grupo dosis normal (T2) y el grupo dosis alta (T3), y corresponden a diferentes grupos de toros a los cuales se les inyectó diferentes dosis de filgrastim (Tabla 1).

6.2.1 Peso Corporal

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal de los toros entre T0, T1, T2 y T3 ($p > 0,05$). Como se observa en la figura 6, la media de peso corporal no cambió significativamente entre los cuatro tratamientos, por lo cual no hubo efecto del filgrastim sobre este parámetro a lo largo de los 60 días de tratamiento.

6.2.2 Circunferencia escrotal

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la medida de circunferencia escrotal de los toros entre T1, T2 y T3 ($p > 0,05$). Como se observa en la figura 7, la media de la circunferencia escrotal no cambió significativamente entre los tres tratamientos, por lo cual no hubo efecto del filgrastim sobre este parámetro a lo largo de los 60 días de tratamiento.

6.2.3 Peso Testicular

En la figura 8 se presenta el peso testicular promedio de los toros bajo los tres tratamientos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el peso testicular de los toros entre T1, T2 y T3 ($p > 0,05$). Por lo tanto, no hubo efecto del filgrastim sobre el peso testicular a lo largo de los 60 días de tratamiento.

6.2.4 Volumen Testicular

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el volumen testicular de los toros entre T1, T2 y T3 ($p > 0,05$). Como se observa en la figura 9, el

volumen testicular promedio no cambió significativamente entre los tres tratamientos, por lo cual no hubo efecto del filgrastim sobre el volumen testicular a lo largo de los 60 días de tratamiento.

6.3 Análisis Histológicos

A partir de las muestras de tejido testicular fijadas en placa, se observó el estado de la espermatogénesis (grupo celular más avanzado, tomando en cuenta que durante la primera ola de la espermatogénesis, en la pre-pubertad, las células germinales más diferenciadas van apareciendo gradual y secuencialmente hasta obtenerse espermatozoides por primera vez en la pubertad), y se contabilizó el número de espermátidas presentes en el volumen de sonda para cada toro para ser utilizadas a través de la prueba estereológica del “disector” para determinar la densidad/testículo, y mediante este dato, el número total de espermatozoides producidos diariamente y por gramo de parénquima testicular (eficiencia de la espermatogénesis). De esta manera, se determinó la producción diaria de espermatozoides por testículo, por toro y por gramo de parénquima testicular. Mediante One-Way ANOVA se comparó estos parámetros bajo los tres tratamientos implementados a lo largo del tiempo. Los tres tratamientos son el grupo control (T1), el grupo dosis normal (T2) y el grupo dosis alta (T3), y corresponden a diferentes grupos de toros a los cuales se les inyectó diferentes dosis de filgrastim.

6.3.1 Número de espermátidas

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de espermátidas de los toros entre T1, T2 y T3 ($p > 0,05$). Como se observa en la figura 10, el número de espermátidas no cambió significativamente entre los tres tratamientos, por

lo cual no hubo efecto del filgrastim sobre este parámetro a lo largo de los 60 días de tratamiento.

6.3.2 Daily sperm production (DSP)

En la figura 11 se presenta el número de espermatozoides producidos diariamente por un testículo de los toros bajo los tres tratamientos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de espermatozoides producidos entre T1, T2 y T3 ($p > 0,05$). Por lo tanto, no hubo efecto del filgrastim sobre el DSP a lo largo de los 60 días de tratamiento.

6.3.3 Daily sperm production (DSP)/Toro

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de espermatozoides producidos por los toros entre T1, T2 y T3 ($p > 0,05$). Como se observa en la figura 12, el número de espermatozoides no cambió significativamente entre los tres tratamientos, por lo cual no hubo efecto del filgrastim sobre este parámetro a lo largo de los 60 días de tratamiento.

6.3.4 Daily sperm production (DSP)/gr.

En la figura 13 se presenta el número de espermatozoides producidos diariamente por gramo de parénquima testicular bajo los tres tratamientos. Sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de espermatozoides producidos entre T1 y T2 ($p < 0,05$). Por lo tanto, sí hubo efecto del filgrastim sobre el DSP/gr. a lo largo de los 60 días de tratamiento.

6.4 Alteraciones Histológicas

Después de analizar y observar las placas en el microscopio, los resultados de identificación de la fase de espermatogénesis y célula más avanzada fueron los siguientes. T0 alcanzó la fase de expansión espermatogonial en un 50%, mientras que el otro 50% fue de la fase de meiosis. Las células más avanzadas de este tratamiento fueron las espermatogonias intermedias (Tabla 1) (Figura 14). El T1 manifestó la fase de espermátidas redondas en un 100%, presentando a su célula más avanzada como espermátidas redondas (Tabla 1) (Figura 14). Por su parte, T2 logró alcanzar la fase de espermátidas redondas en un 75%, y espermátidas elongadas en un 25% correspondiendo al ciclo más avanzada de espermatogénesis de la presente investigación. De igual manera, las células más avanzadas de T2 fueron las espermátidas elongadas (Tabla 1) (Figura 14). Por último, T3 alcanzó la fase de espermátidas redondas en un 100%, siendo su célula más avanzada las espermátidas redondas (Tabla 1) (Figura 14).

7. DISCUSIÓN

En la actualidad monitorear la función reproductiva y el desarrollo sexual de los animales es fundamental para el mejoramiento de los programas de producción animal (Gasque, 2016). Desde el punto de vista genético y económico, acelerar el desarrollo sexual es una herramienta vital debido a que permite conocer los resultados genéticos de manera anticipada, permite aumentar la vida productiva de los animales y aumenta las ganancias económicas (Gutierrez et al., 2017). En la presente investigación se evidencia por primera vez los efectos del uso de r-met-hu G-CSF (Filgrastim) en el desarrollo sexual de bovinos prepuberales, mediante la monitorización de la función

testicular y el análisis de perfiles hematológicos de la serie blanca. A través de estas metodologías se puede llegar a conocer el mecanismo de acción de este factor de crecimiento en tejidos no hematopoyéticos (Sánchez, 2015).

Evaluar el efecto r-met-hu G-CSF en el período prepuberal de los toros significa un amplio espectro de investigación considerando que la espermatogenesis arranca desde este período con la activación y proliferación del pool de células madre germinales, y termina con la maduración de los primeros espermatozoides (Kim et al., 2015). Estudios en corderos y ratones proporcionan evidencia de que r-met-hu G-CSF puede estar involucrado en la primera ola de proliferación de las células madre espermatogoniales al inicio de la espermatogenesis (Aponte et al., 2018). Asimismo, no sólo se han demostrado procesos de proliferación bajo la acción de este factor de crecimiento, sino que también es capaz de revertir procesos de radiación o fármacos que eliminan células germinales a nivel testicular (Kim, Lee, & Jeon, 2011).

El primer parámetro analizado es el de la serie blanca. En este caso, tanto el control como los tratamientos no mostraron cambios significativos en la cantidad de glóbulos blancos, a lo largo del tratamiento, independientemente del tipo celular.

Esto puede explicarse debido al estrés generado y a la fatiga de los animales durante el tratamiento, ya que existe relación entre el estrés físico y psicológico con el recuento de glóbulos blancos. Se conoce que altos niveles de cortisol y adrenalina debilitan el sistema inmune (Nishitani & Sakakibara, 2014). Asimismo, se sabe que todas las células del cuerpo reaccionan al estrés produciendo efectos beneficiosos o negativos. En este caso las células blancas no son la excepción, y generalmente tienden a debilitarse ante estímulos de estrés constantes. Existe un nivel de equilibrio el cual depende de

factores individuales (disposición psicológica y biológica) de las distintas situaciones o experiencias (Nogareda, 1999). Pese a que no se midieron los niveles de cortisol en los toros durante los días de tratamiento, estos mantuvieron un estrés constante y mucha fatiga, lo cual indudablemente elevó los niveles de cortisol, adrenalina y noradrenalina. Además, existe una relación significativa entre el temperamento y la productividad de los bovinos, y precisamente la raza Brahman presenta un temperamento nervioso altamente excitable. Es decir, ante cualquier estímulo externo reaccionan de manera violenta y rápida, tendiendo al escape y a permanecer en manada (Lanier & Green, 2000). Se esperaba un aumento significativo de la cantidad de células blancas debido a que estudios realizados en humanos, cerdos y ratones argumentan que r-met-hu G-CSF mejora la movilización de glóbulos blancos a corto plazo, de tal manera que estos aumentan en número a los pocos días de tratamiento (Satyamitra et al., 2017). Sin embargo, el ligero aumento en eosinófilos y basófilos durante los primeros días de tratamiento nos indica movilización de la médula ósea en los bovinos de la raza Brahman.

A pesar de que no hubo cambios significativos en la mayoría de los tipos celulares de la línea blanca, se pudo ver un incremento en el porcentaje de neutrófilos y monocitos al segundo día de tratamiento con la dosis alta, lo cual indica que a partir de esta dosis de Filgrastim ya es suficiente para activar y movilizar células madre hematopoyéticas, por lo cual se deben considerar dosis mayores para activar todas las células blancas (Aponte et al., 2018). En cerdos se ha evidenciado movilización hematopoyética después del uso de altas dosis de Filgrastim (100 ug/Kg). Por otra parte, se ha observado que bajas dosis (<5 ug/Kg) son usadas para efectos terapéuticos (Hashimoto et al., 2002).

La dinámica celular así como la producción de hormonas juegan un papel vital en todo el proceso de la espermatogénesis. El desarrollo de los espermatozoides y su regulación están controlados por un eje hormonal-celular bien establecido que incluye el hipotálamo, pasando por la hipófisis y finalmente en el testículo (Lie et al., 2010). Para ver el efecto de r-met-hu G-CSF a nivel del tejido testicular, se estimó el número de espermátidas, la producción diaria de espermatozoides (DSP) y la eficiencia de la espermatogénesis (DSP/ gr. de parénquima testicular) entre los diferentes tratamientos. Los resultados obtenidos manifiestan *a priori* que el efecto de las dosis establecidas no fue suficiente, y que al igual que en los efectos hematopoyéticos, fue necesario considerar dosis más altas para poder ver efectos trascendentales. Particularmente, no hubo efecto del filgrastim sobre la producción de espermátidas y sobre la producción de espermatozoides bajo ningún tratamiento. Estos resultados pueden deberse a factores intrínsecos relacionados con la fisiología diferencial entre tejidos, lo cual suele repercutir en el aumento o disminución de la actividad del proceso espermatogénico (Gutierrez et al., 2017). De igual manera, hay que considerar el umbral de acción del r-met-hu G-CSF a lo largo de toda la espermatogénesis, el cual es muy amplio, por lo tanto puede afectar o no los diferentes eventos celulares ocurridos durante el proceso (Bilaspuri & Guraya, 1986).

Por otra parte, la eficiencia de la espermatogénesis sí se vio afectada, y con la dosis normal se obtuvieron diferencias significativas en la producción diaria de espermatozoides por gramo de parénquima testicular en comparación con el control. Esto sugiere que r-met-hu G-CSF sí afectó la dinámica de los procesos espermatogoniales. Es probable que haya ocurrido un estímulo en la liberación de GnRH y un aumento de los receptores a nivel testicular. Esto también podría haber

activado diferentes cascadas de señalización celular estimuladas por hormonas como la FSH, LH, testosterona, que unicamente son producidas tras la liberación de GnRH en el eje hipotálamo hipofisiario.

De esta manera, se puede inferir que tras la aplicación de r-met-hu G-CSF se aceleró el proceso de espermatogénesis, especialmente la fase de meiosis, lo cual estimula la primera onda espermatogénica, acelerando la producción de espermatidas y finalmente espermatozoides, tal como se menciona en estudios similares realizados en corderos (Aponte et al., 2017). Cada especie tiene valores específicos de eficiencia de la espermatogénesis. Con este reporte se puede evidenciar que factores intrínsecos, en este caso un factor de crecimiento, son capaces de modificar estos parametros que se creían fijos para las especies. Incluso podría modificarse la tasa de proliferación de las células madre espermatogoniales bajo efecto del filgrastim, lo cual deberá comprobarse tanto *in vitro* como *in vivo*.

En cuanto al peso y volumen testicular, no se observaron cambios acentuados entre los diferentes grupos tratados. Pese a que el tratamiento (dosis normal) mostró un leve incremento en comparación con el control, este no fue significativo. Esto indica que r-met-hu G-CSF podría tener un efecto sobre el crecimiento del tejido testicular sin embargo hay que reconsiderar las dosis para bovinos con el fin de obtener resultados más contundentes (Gutierrez et al., 2017). El crecimiento y desarrollo de los testículos normalmente ocurre a expensas del incremento de los túbulos seminíferos en longitud y en diametro, al desarrollo de los espacios tubulares e intertubulares, y al crecimiento de la porción de parénquima testicular, considerando que los túbulos representan más del 80% del peso testicular (Madrid, 2015).

Finalmente, al analizar los resultados del peso corporal es evidente que este no mostró cambios significativos a lo largo del tratamiento. Por lo tanto, no hubo un efecto contundente de r-met-hu G-CSF sobre este parámetro. Sin embargo no se puede atribuir efectos directos de este medicamento sobre el peso corporal debido a la falta de estudios y relaciones dosis-peso. Incluso en seres humanos se tiene poca información a cerca de la incidencia de r-met-hu G-CSF sobre el peso corporal (Eftekhari, Naghshineh, & Khani, 2018). Al analizar los datos productivos de peso hay que considerar varios factores nutricionales, genéticos y ambientales que indican una correcta ganancia de peso en los sistemas de producción (Asocebú, 2015). En este caso los animales mostraron pesos arriba de los 230 Kg a los 13 meses de edad evidenciando ganancias diarias de peso de 170 gr. Esto difiere con otros resultados productivos de la crianza de ganado Brahman donde se han obtenido ganancias diarias de peso arriba de los 400 gr. (Murcia, 2013). La baja ganancia diaria de peso se puede deber al estrés provocado durante las manipulaciones de los animales durante el período experimental.

Los resultados tanto hematopoyéticos como celulares evidencian que hubo un efecto dosis-dependiente en cuanto a la activación y aceleración tanto de la médula ósea como del proceso espermatogénico a nivel testicular, lo cual ha sido comprobado en otras especies (Gutierrez et al., 2017).

8. CONCLUSIONES

La aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim) afectó positivamente la eficiencia de la espermatogénesis en bovinos prepúberes de la raza Brahman lo cual indica que sí sucedieron cambios en la dinámica celular a nivel testicular. Sin embargo, la

aplicación de este medicamento no aumentó la producción de espermatozoides, lo cual sugiere una reevaluación de la dosis del factor de crecimiento.

No se observa una respuesta óptima de r-met-hu G-CSF (Filgrastim) a nivel hematológico como macro-morfológico. Sin embargo, se notaron cambios al aplicar las dosis más elevadas, lo cual sugiere un ajuste en la cantidad de la droga aplicada con el fin de obtener resultados más contundentes.

Es necesario realizar futuros trabajos en relación a los efectos de la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim) para evaluar la influencia de esta factor de crecimiento en el desarrollo sexual de bovinos prepúberes, sólo o en combinación con otros factores de crecimiento/hormonas.

9. RECOMENDACIONES

- Considerar un mayor número de toros en el experimento, si es factible, con el fin de reducir la variabilidad.
- Establecer otros esquemas de dosificación y más tratamientos con el fin de obtener resultados más contundentes.
- Realizar estudios hormonales con el fin de correlacionar la actividad hormonal con la actividad celular post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim).
- Considerar una raza bovina más dócil con el fin de evitar la producción de altas concentraciones de cortisol, lo cual puede afectar los resultados.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acebo, M. (2016). Estudios Industriales Orientación Estratégica para la Toma de Decisiones Industria de Ganadería de Carne. *ESPAE-ESPOL*, 8-10. Obtenido de <http://www.espae.espol.edu.ec/wp-content/uploads/2016/12/industriaganaderia.pdf>
- AEP. (2016). *Filgrastim*. Obtenido de Pediamécum: <http://pediamecum.es/wp-content/farmacos/Filgrastim.pdf>
- Alemaný, A. (2017). *Estudio Molecular de la Meiosis en Mamíferos*. Obtenido de Universitat de les Illes Balears: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/458994/tesamas1de1.pdf?sequence=1>
- Aponte, P. (2001). Evaluación Morfológica Cuantitativa de la Espermatogénesis en Bovinos de Raza Brahman Durante el Período Prepuberal . *Universidad Central de Venezuela*, 5-21.
- Aponte, P., Gutierrez, M., Sanchez, E., & García, M. (2018). Differential role of r-met-hu G-CSF on male reproductive function and development in prepubertal domestic mammals. 1-28.
- Aponte, P., Rooji, D., & Bastidas, P. (2005). Testicular development in Brahman bulls. *Elsevier*, 1440-1455.
- Asocebú. (2015). Características de la raza brahman . *Asocebú Colombia*.
- Bastidas, P. (1999). Pubertad en Novillas y Toros Brahman . *Sitio Argentino de Producción Animal* , 4-6.

- Belibasaki, N., & Kouimtzis, N. (2000). Sexual activity and body and testis growth in prepubertal ram lambs of Friesland, Chios, Karagouniki and Serres dairy sheep in Greece. *Small Rumin Res*, 109-113.
- Bilaspuri, G., & Guraya, S. (1986). The seminiferous epithelial cycle and spermatogenesis in rams (ovis aries). *Theriogenology*, 485-505.
- Bruss, S., Schuppe, H., & Schill, W. (2004). The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. *Wiley Online Library*, 337-345.
- Catalán, M., Álvarez, M., Sádaba, J., & Honorato, J. (1992). *Filgrastim: Factor estimulante de colonias de granulocitos*. Obtenido de Facultad de Medicina. Universidad de Navarra:
[http://dadun.unav.edu/bitstream/10171/34625/1/Rev_med_univ_Navarra_1993_38\(2\)_33_8.pdf](http://dadun.unav.edu/bitstream/10171/34625/1/Rev_med_univ_Navarra_1993_38(2)_33_8.pdf)
- Cuaran, E., & Burbano, J. (2014). Evaluación en la criopreservación de semen colectado directamente de epidídimos en bovinos por dos métodos (laundrying - epididymis, slicing -testicles) en el laboratorio de biotecnología en reproducción de la carrera de medicina veterinaria. *Universidad Técnica de Cotopaxi*, 111.
- Desnoyers, L., Théarien, I., & Manjunath, P. (1994). Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Wiley Online Library*, 425-435.
- Eftekhari, M., Naghshineh, E., & Khani, P. (2018). Role of Granulocyte colony-stimulating factor in human reproduction. *Res Med*.
- ESPAC. (2017). *INEC*. Obtenido de Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2017/Presentacion_Principales_Resultados_ESPAC_2017.pdf

- Espitia, A., Prieto, E., & Cardozo, J. (2006). Pubertad y Circunferencia Escrotal en Toros Holstein x Cebu, Cebu y Romosinuano. *Rev. MVZ Córdoba*, 744-745.
- FAO. (2014). *Ganado y Producción Animal*. Obtenido de Producción y Sanidad Animal: http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/animal_production.html
- Flores, C. (2012). *Análisis de la Variabilidad Técnica Económica y Financiera para la Creación de la Microempresa Ganadera "La Esperanza" Ubicada en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas Parroquia Alluriquin, en Beneficio de la Comunidad "El Valle"*. Obtenido de Universidad Central del Ecuador : <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1635/1/T-UCE-0005-228.pdf>
- Gasque, R. (2016). Reproducción Bovina. *Sitio Argentino de Producción animal*, 1-10.
- Gnemmi, C., & Lefebvre, R. (2009). Ultrasound Imaging of the Bull Reproductive Tract: An Important Field of Expertise for Veterinarians. *ELSEVIER*, 767-779.
- Gonzalez, K. (10 de Enero de 2019). *La Raza de Ganado Brahman*. Obtenido de Zootecnia y Veterinaria es mi pasión: <https://zoovetesmiopcion.com/ganaderia/razas-bovina/la-raza-de-ganado-brahman/>
- Griswold, M. (2015). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *American Physiological Reviews*, 1-17.
- Gutierrez, M., Aponte, P., Ilbay, E., & García, M. (2017). Efecto de la Aplicación del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos Recombinante Humano (r-met-hu G-CSF) en el Desarrollo Sexual de Corderos Prepúberes. *Spermova*, 93-99.
- Hashimoto, S., Itoh, M., & Nishimura, M. (2002). Effect of Filgrastim administration for steady-state mobilization of peripheral blood stem cells. *Ther Apher*, 431-436.

- Haynes, A. (n.d). *Caracteres Raciales y Adaptación al Medio*. Obtenido de Sitio Argentino de Producción Animal : http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/externior/27--haynes.pdf
- Hiramatsu, M., Yoshida, Y., & Koda, A. (1975). [Pharmacological action of cattle prostate extracts (PE). V. Effect on the bladder]. *MEDLINE*, 19-28.
- IQB. (2014). *Filgrastim* . Obtenido de Vademecum:
<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/f020.htm>
- JICA. (2016). *Manual del Protagonista Reproducción Animal* . Obtenido de Instituto Nacional Tecnológico Dirección General de Formación Profesional :
https://www.jica.go.jp/project/nicaragua/007/materials/ku57pq0000224spz-att/Reproduccion_Animal.pdf
- Jiménez, E. (2013). Aportaciones a la Criopreservación del Esperma de Gato Doméstico: Influencia de las Soluciones Diluyoconservadoras . *Universidad de Córdoba*, 16-18.
- Johnson, L. (1995). Efficiency of spermatogenesis. *Wiley Online Library*, 385-422.
- Kim, J., Lee, S., & Jeon, B. (2011). Protection of spermatogenesis against gamma ray-induced damage by granulocyte colony-stimulating factor in mice. *Andrología*, 87-93.
- Kim, K.-J., Kim, B.-G., & Kim, Y.-H. (2015). In Vitro Spermatogenesis Using Bovine Testis Tissue Culture Techniques. *TERM*, 314-323.
- Ladino, C., & Navarro, O. (2017). Caracterización del Comportamiento Sexual de Toros Brahman en los Períodos Climáticos de la Sabana Inundable de la Orinoquía Colombiana. *Universidad de la Salle*, 11-20.

- Lanier, J., & Green, R. (2000). La Relación entre el temperamento del animal y su relación a estímulos subitos e intermitentes. *Journal of Animal Science*, 1467-1474.
- Lie, P., Mruk, D., Lee, W., & Cheng, C. (2010). Cytoskeletal dynamics and spermatogenesis. . *The Royal Society*, 1581-1592.
- Loayza, N. (2009). *Anatomía y Fisiología del Aparato Reproductor del Macho Bovino*. Obtenido de Repositorio Institucional. Universidad de Cuenca:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/17783>
- Madrid, N. (2015). Medida de la circunferencia escrotal . *Engormix*.
- Málaga, Y., Ortiz, D., Hernández, I., Tovar, J., & Ayala, A. (2005). Detención de la espermatogénesis. *Mediagraphic Artemisa*, 500-508.
- Marina, S. (2003). Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 213-225.
- Martins, C., Silva, A., Dode, M., Rumpf, R., Cumpa, H., Silva, C., & Pivato, I. (2015). Morphological characterization and conservation of bovine spermatogenic cells by refrigeration at 4°C and freezing using different cryoprotective molecules. *Elsevier*, 47-53.
- Murcia, J. (2013). Relación del peso al Nacer con el peso al destete y el peso a los 18 meses en un hato de cría Brahman puro en Tame (Arauca). *Universidad de la Salle*, 19-21.
- Nichi, M. (2017). Evaluation of epididymis storage temperature and cryopreservation conditions for improved mitochondrial membrane potential, membrane integrity, sperm motility and in vitro fertilization in bovine epididymal sperm. *Wiley Online Library*, 257-263.

- Nishitani, N., & Sakakibara, H. (2014). Association of Psychological Stress Response of Fatigue with White Blood Cell Count in Male Daytime Workers. *Industrial Health*, 531-534.
- Nogareda, S. (1999). Fisiología del estrés. *Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo*, 1-10.
- Oatley, J., De Avila, D., & Reeves, J. (2004). *Biology of Reproduction*. Obtenido de Spermatogenesis and Germ Cell Transgene Expression in Xenografted Bovine Testicular Tissue:
<https://academic.oup.com/biolreprod/article/71/2/494/2667314>
- Olivera, M., Ruíz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El Espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 426-436.
- Phillips, B., Gassei, K., & Orwing, K. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *The Royal Society*, 1663–1678.
- Rangel, L., Alarcón, M., & Galina, C. (2009). *Manual de Prácticas de Reproducción Animal*. Obtenido de Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia:
http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/M anual%20de%20Practicas%20de%20Reproduccion%20Animal.pdf
- Revelo, M. (11 de Febrero de 2016). *Generalidades del Manejo de la Hembra Bovina Prepúber*. Obtenido de Engormix: <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/generalidades-manejo-hembra-bovina-t33019.htm>
- Riquelme, T. (2015). Historia del Ganado Brahman. *Revista Brahman*, 30-33.

- Sánchez, E. (2015). Obtención de Células Madre Hematopoyéticas Utilizando Filgrastim a 3 Diferentes Dosis 5, 10 y 15 Microgramos en cuyes (*Cavia Porcellus*). *Universidad Técnica de Cotopaxi*, 5-18.
- Satyamitra, M., Kumar, V., & Biswas, S. (2017). Impact of Abbreviated Filgrastim Schedule on Survival and Hematopoietic Recovery after Irradiation in four mouse Strains with Different Radiosensitivity. *Radiat Res*, 659-671.
- Sexual activity and body and testis growth in prepubertal ram lambs of Friesland, Chios, Karagouniki and Serres dairy sheep in Greece. (s.f.). *Sammll*.
- Shinsuke, N., Suzuki, Y., & Hisayuki, N. (2015). G-CSF supports long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy. *Nature Communications*.
- Shukla, K., Mahdi, A., & Rajender, S. (2012). Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. 746-754.
- Silva, J. D. (19 de Enero de 2018). Aprovechar el Sector Ganadero para el Desarrollo Sostenible. *El País*.
- Staub, C., & Johnson, L. (2018). Spermatogenesis in the bull. *Cambridge Core*, 27-35.
- Vela, J. (2016). Análisis de competitividad de la Cadena de la Carne Bovina en el Ecuador, periodo 2007-2014. *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*, 45-53.
- Wright, C., Ward, A., & Russel, A. (2017). Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Potential Application for Skeletal Muscle Repair and Regeneration. *Hindawi*.

11. TABLAS

Tabla 1. Resumen de los tratamientos realizados

| <i>TRATAMIENTO</i> | <i>n</i> | <i>DÍA CASTRACIÓN</i> | <i>CÉLULA MÁS AVANZADA</i> | <i>EDAD (meses)</i> | <i>FASE ESPERMATOGÉNESIS</i> |
|--------------------|----------|---------------------------|---|-------------------------|---|
| Control inicial | 2 | 0 | Paquiteno | 11 | Expansión espermatogonial (In) 50% Meiosis 50% |
| | | | Espermatogonias Intermedias | | |
| Controles | 3 | 60 | Espermátidas Redondas | 13 | Espermátidas Redondas 100% |
| Dosis Normal | 4 | | Espermátidas Redondas | | Espermátidas Redondas 75% Espermátidas Elongadas 25% |
| | | | Espermátidas Redondas Espermátidas Elongadas | | |
| Dosis Alta | 3 | Espermátidas Redondas | Espermátidas Redondas 100% | | |

La tabla indica los diferentes tratamientos con el número de toros usados, su edad, su fecha de castración, su respectiva fase de espermatogénesis y célula más avanzada.

12. FIGURAS

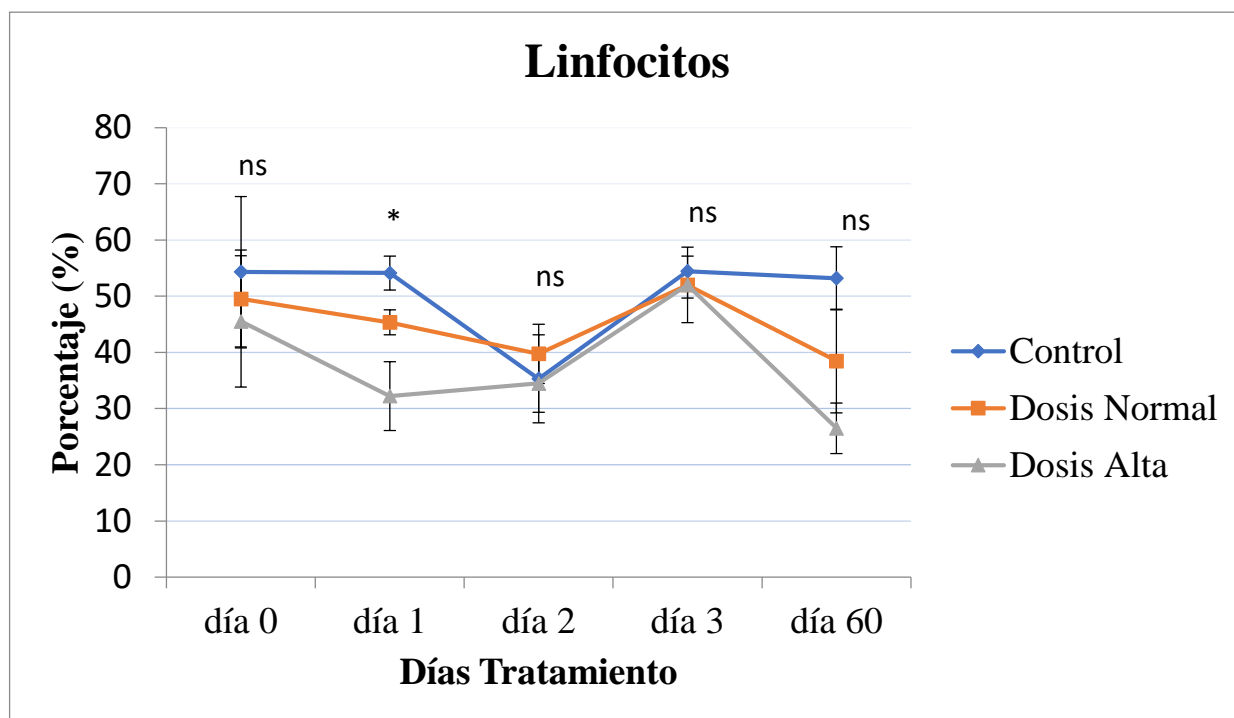


Figura 1. Cantidad de linfocitos tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

[(T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.; (T3 Dosis alta) 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p. v.;] en toros prepúberes durante los días del tratamiento. Valores métricos hematológicos [Linfocitos (%)]. ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

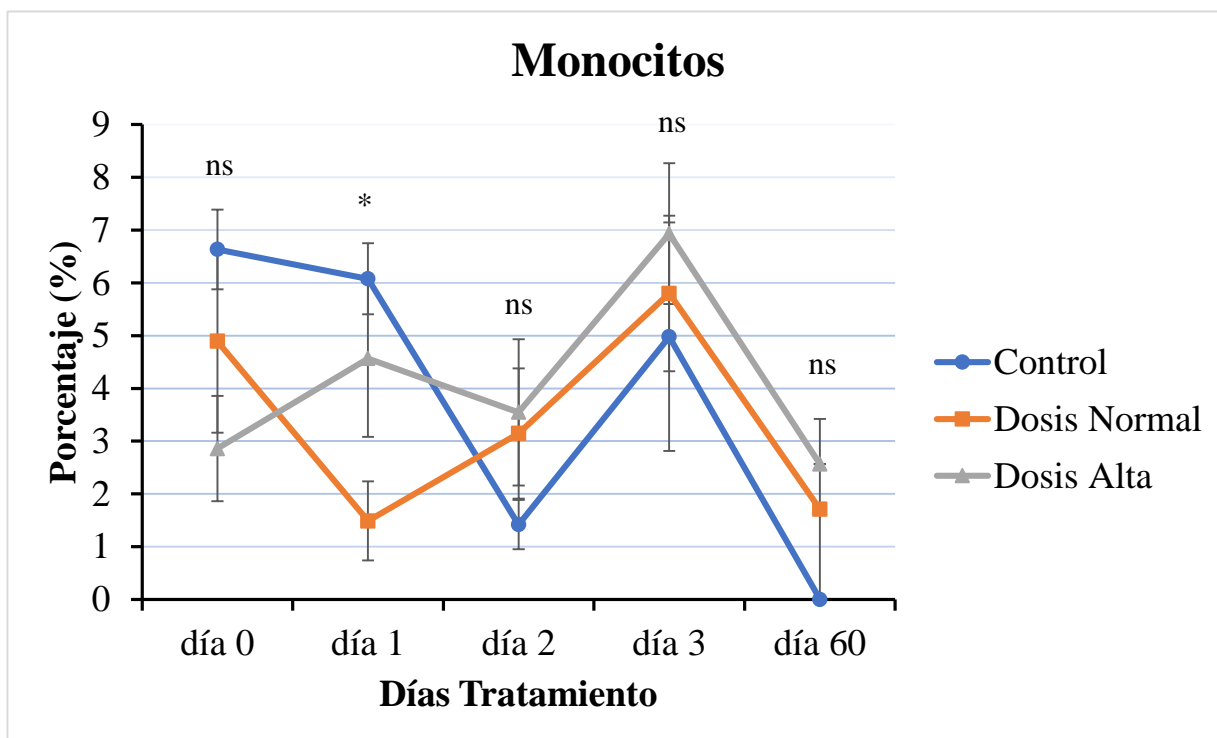


Figura 2. Cantidad de monocitos tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

[(T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.; (T3 Dosis alta) 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p. v.]; en toros prepúberes durante los días del tratamiento. Valores métricos hematológicos [Linfocitos (%)]. ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

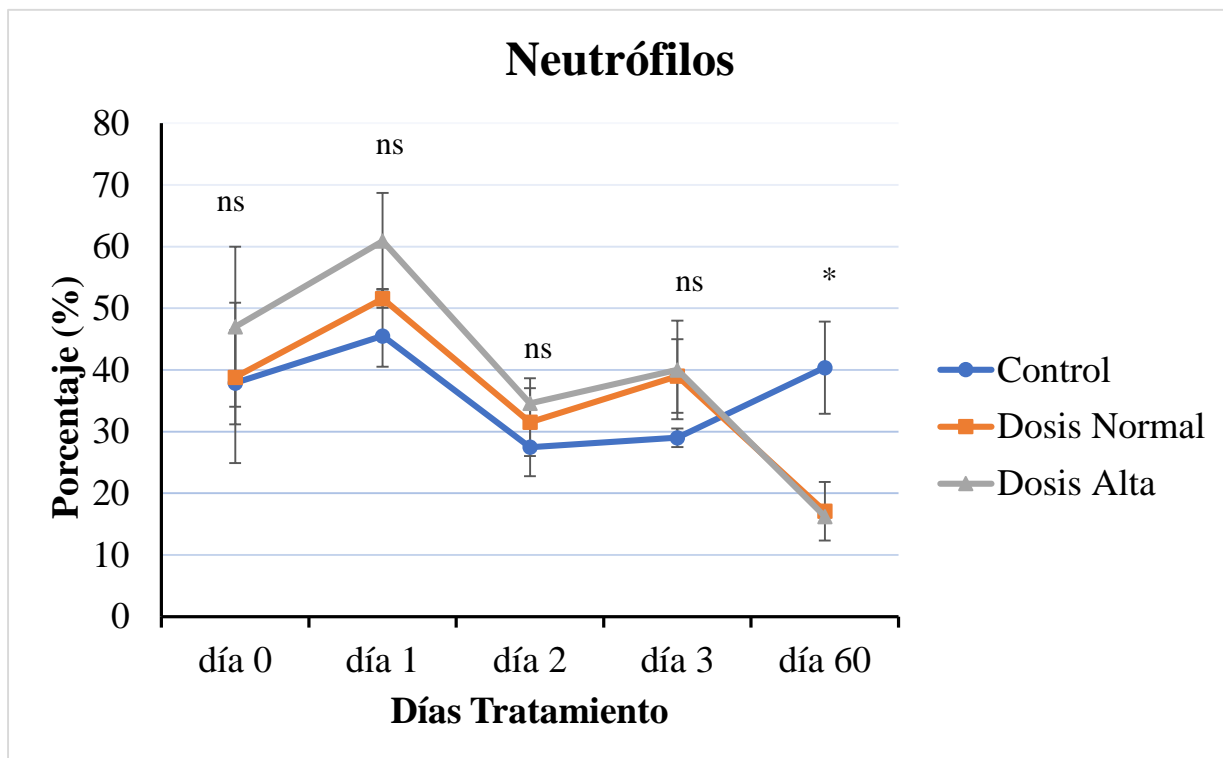


Figura 3. Cantidad de neutrófilos tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

[(T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.; (T3 Dosis alta) 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p. v.] en toros prepúberes durante los días del tratamiento. Valores métricos hematológicos [Linfocitos (%)]. ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

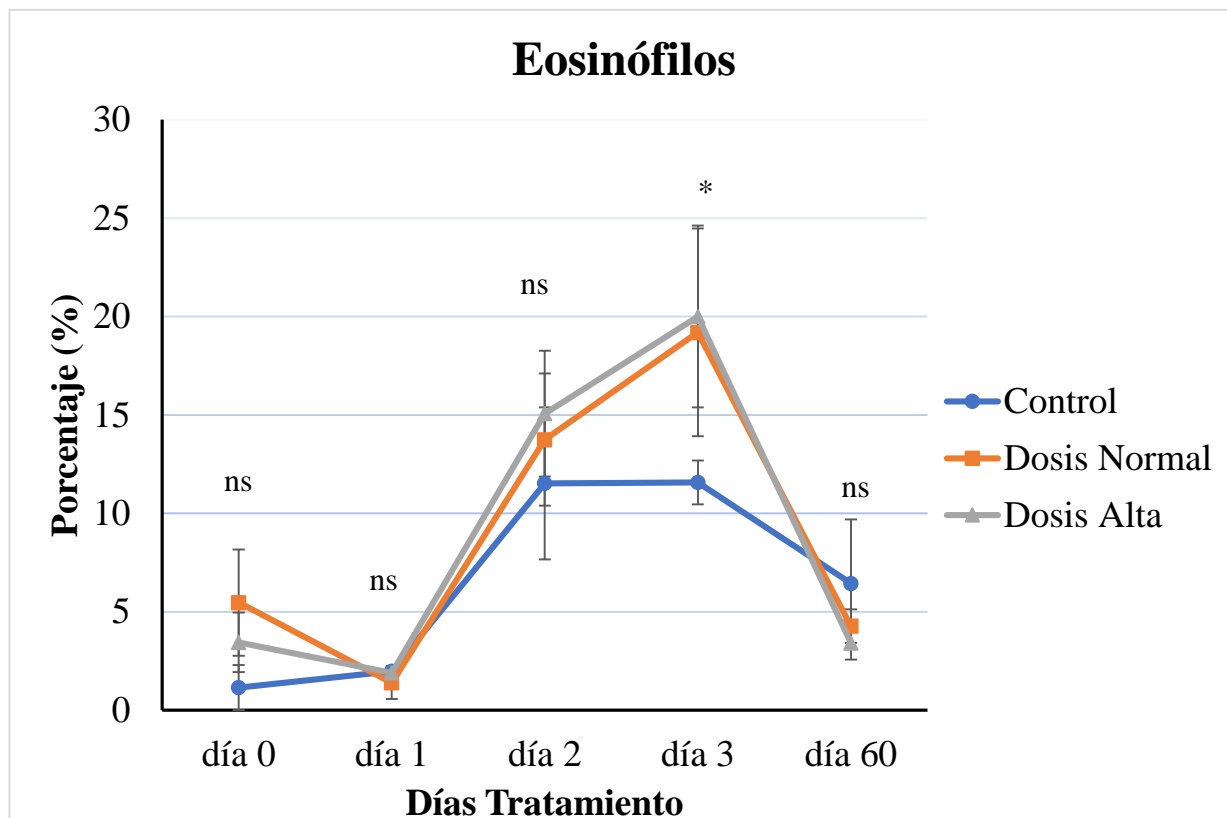


Figura 4. Cantidad de eosinófilos tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

[(T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.; (T3 Dosis alta) 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p. v.;] en toros prepúberes durante los días del tratamiento. Valores métricos hematológicos [Linfocitos (%)]. ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

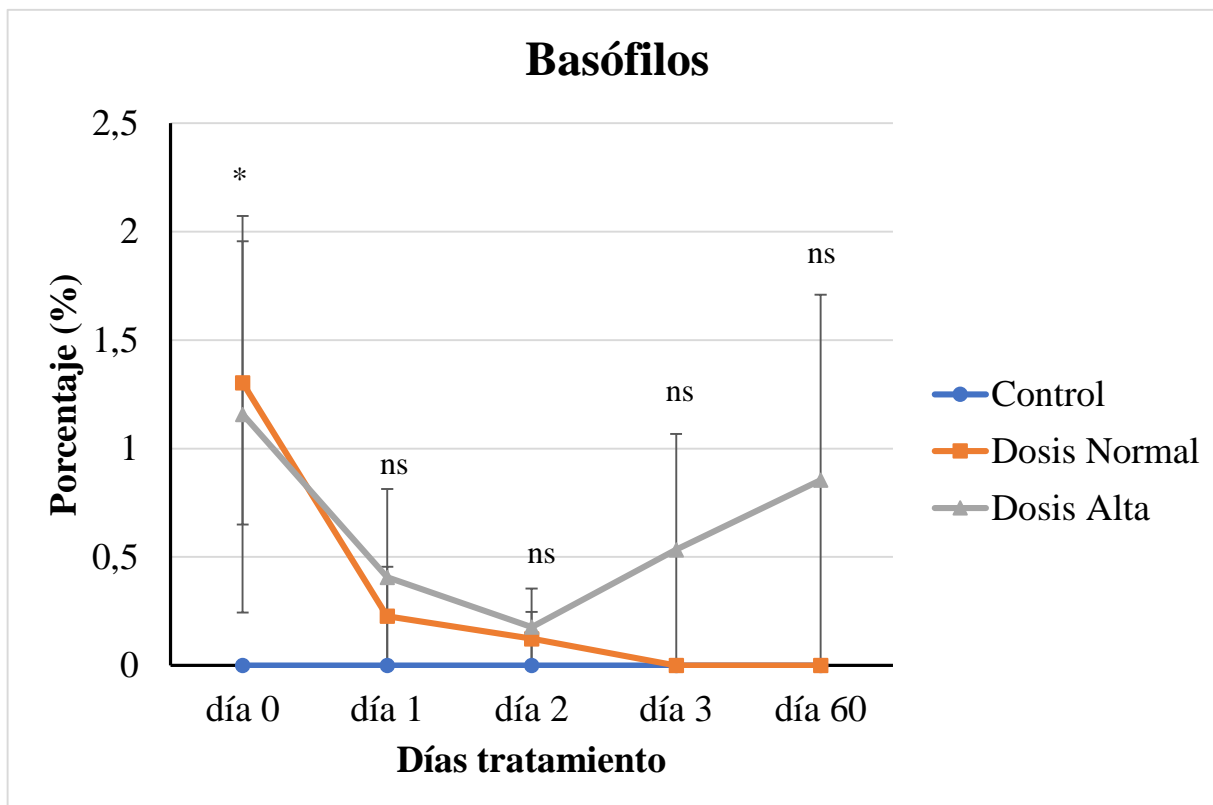


Figura 5. Cantidad de basófilos tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

[(T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.; (T3 Dosis alta) 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p. v.] en toros prepúberes durante los días del tratamiento. Valores métricos hematológicos [Linfocitos (%)]. ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

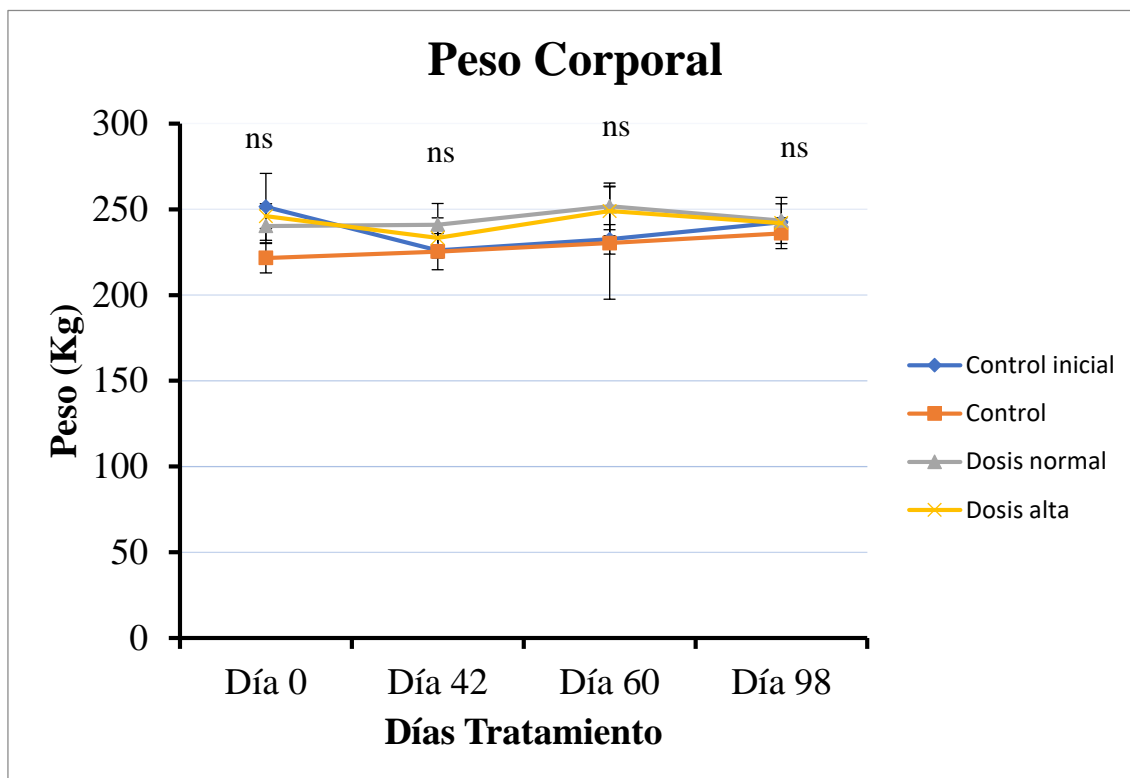


Figura 6. Peso corporal tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

[(T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.; (T3 Dosis alta) 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p. v.] en toros prepúberes durante los días del tratamiento. Valores métricos hematológicos [Linfocitos (%)]. ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

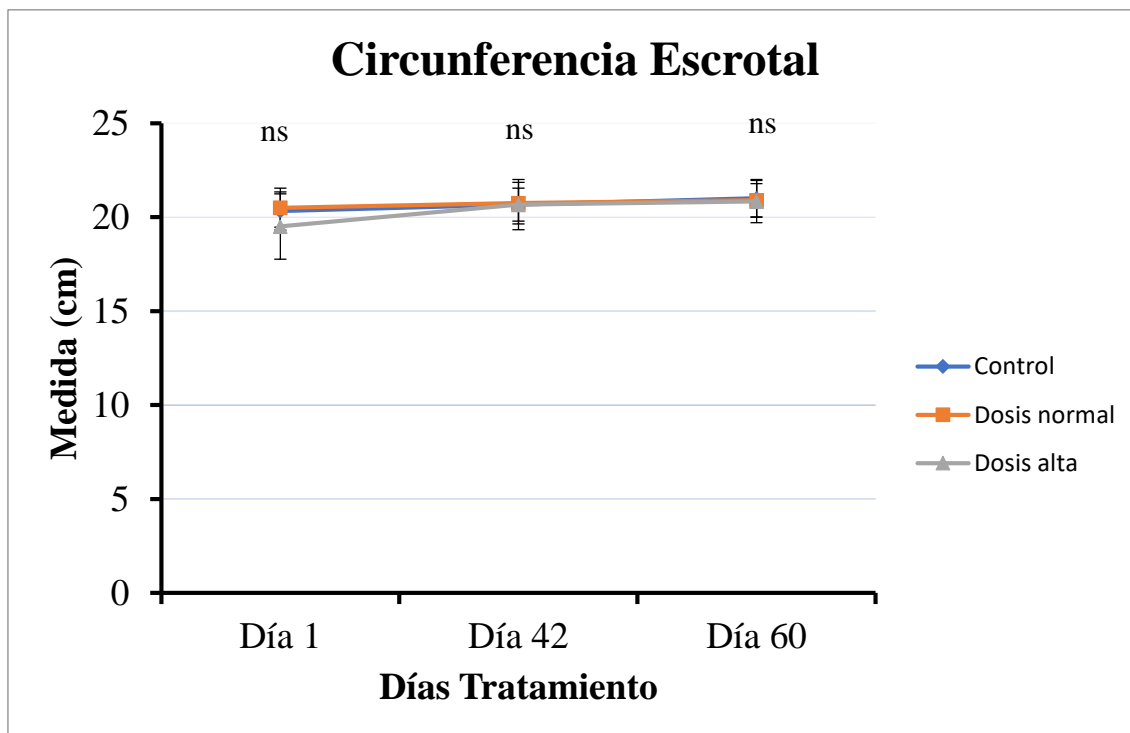


Figura 7. Circunferencia escrotal tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

[(T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.; (T3 Dosis alta) 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p. v.;] en toros prepúberes durante los días del tratamiento. Valores métricos hematológicos [Linfocitos (%)]. ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

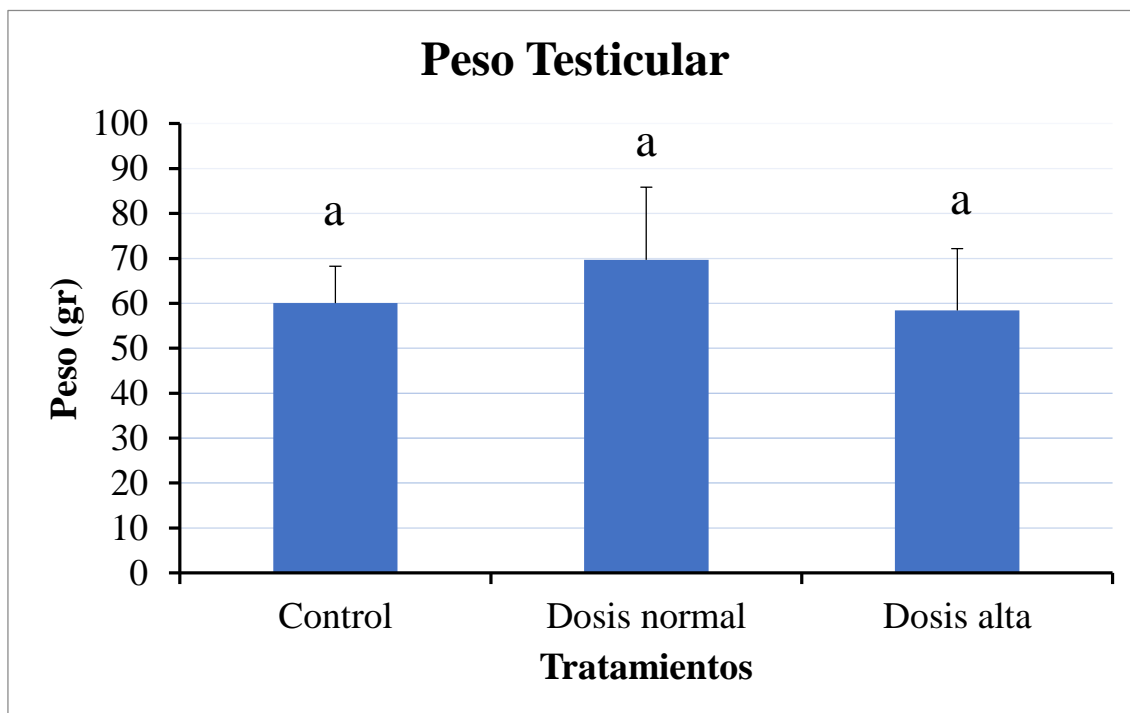


Figura 8. Peso testicular (gr) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.; (T3 Dosis alta) 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p. v.] en toros prepúberes al final del período experimental. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y Las diferentes letras (a-c) en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

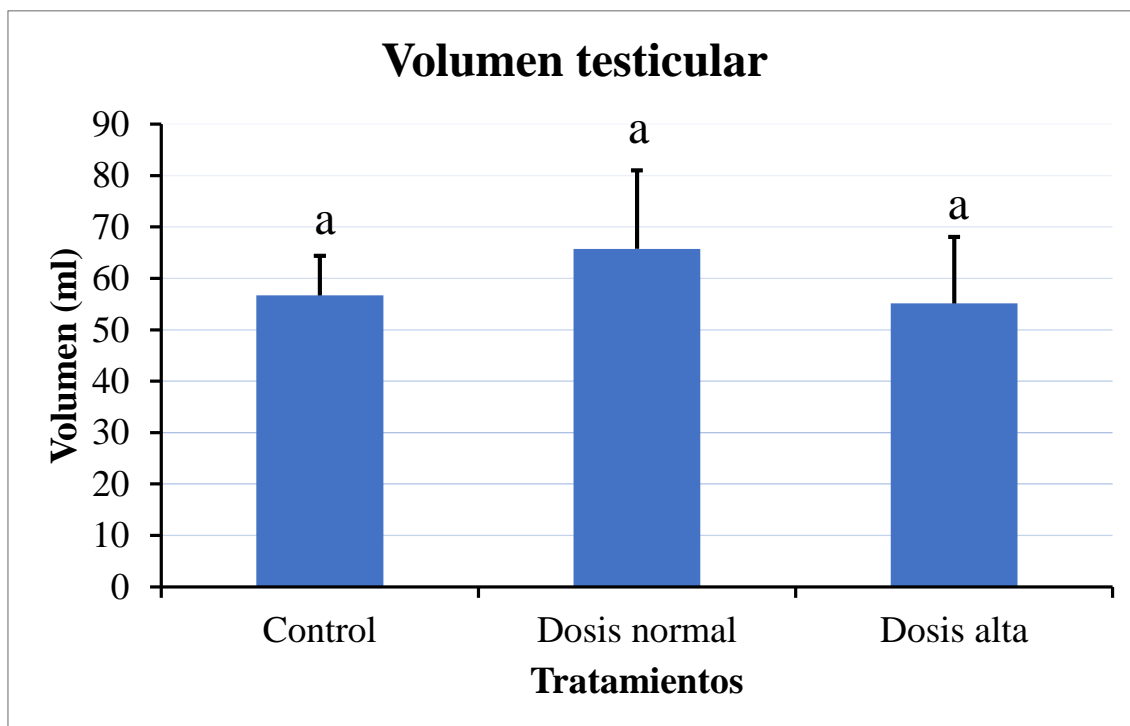


Figura 9. Volumen testicular (ml) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.; (T3 Dosis alta) 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p. v.] en toros prepúberes al final del período experimental. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y Las diferentes letras (a-c) en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

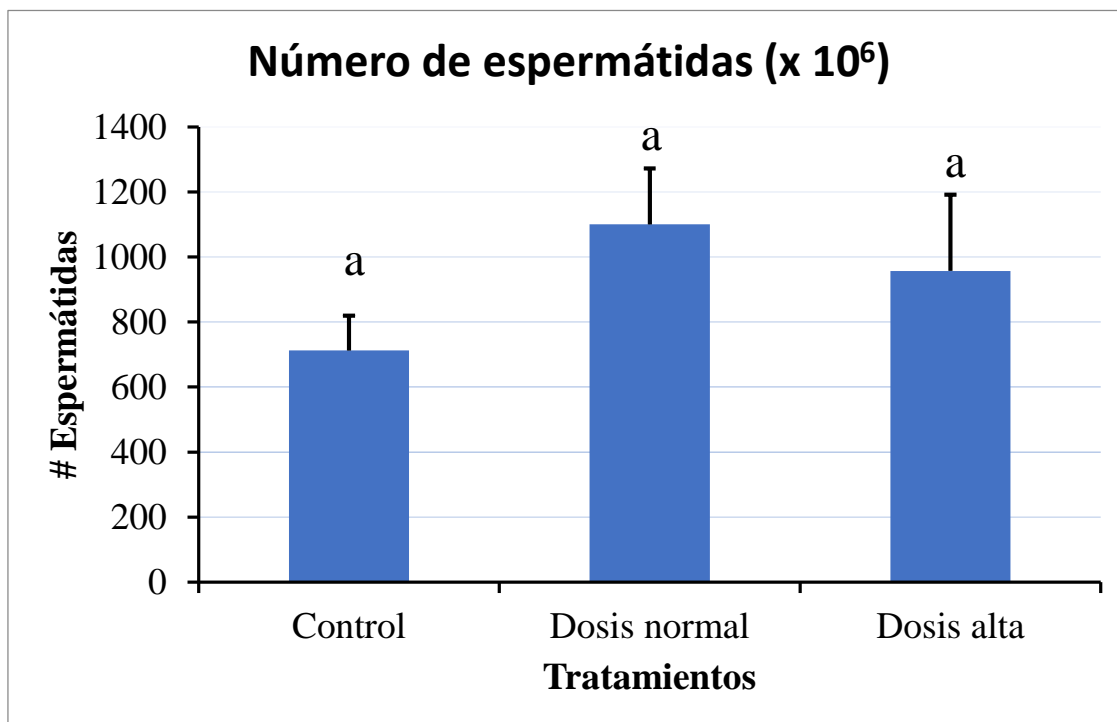


Figura 10. Número de espermátidas (x10⁶) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 µg/kg p.v.; (T3 Dosis alta) 4 µg/kg p. v.] en toros prepúberes al final del período experimental. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y Las diferentes letras (a-c) en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

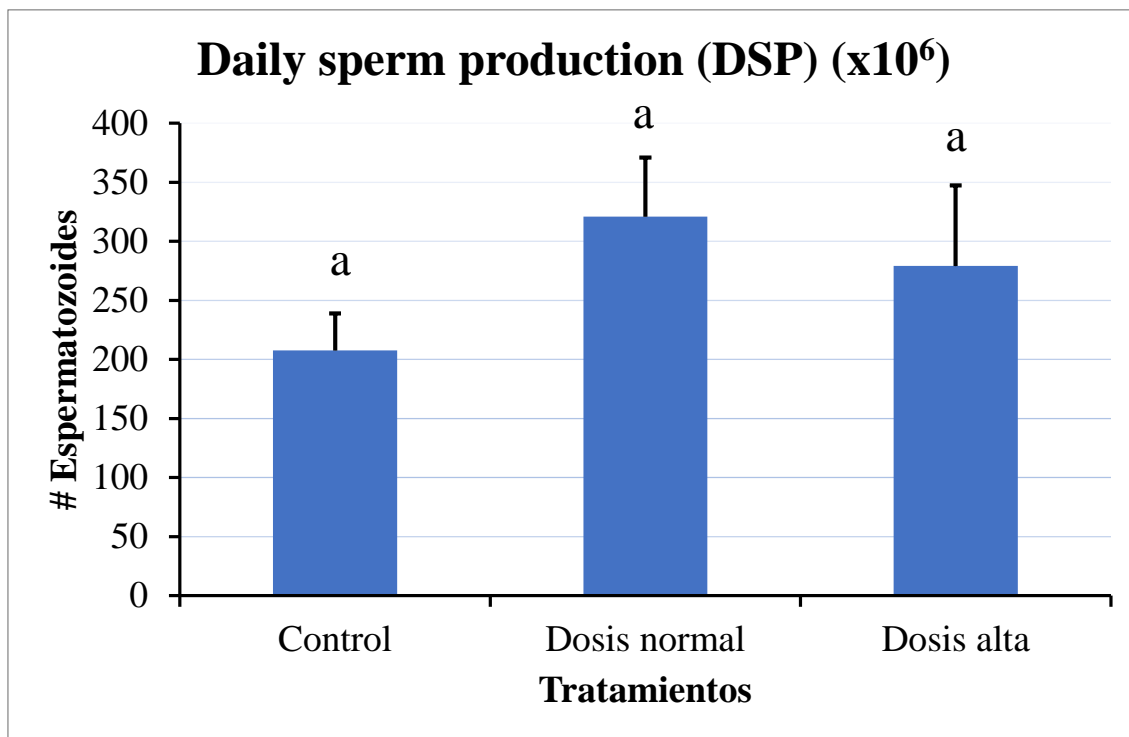


Figura 11. Daily sperm production (DSP) ($\times 10^6$) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.; (T3 Dosis alta) 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p. v.] en toros prepúberes al final del período experimental. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y Las diferentes letras (a-c) en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

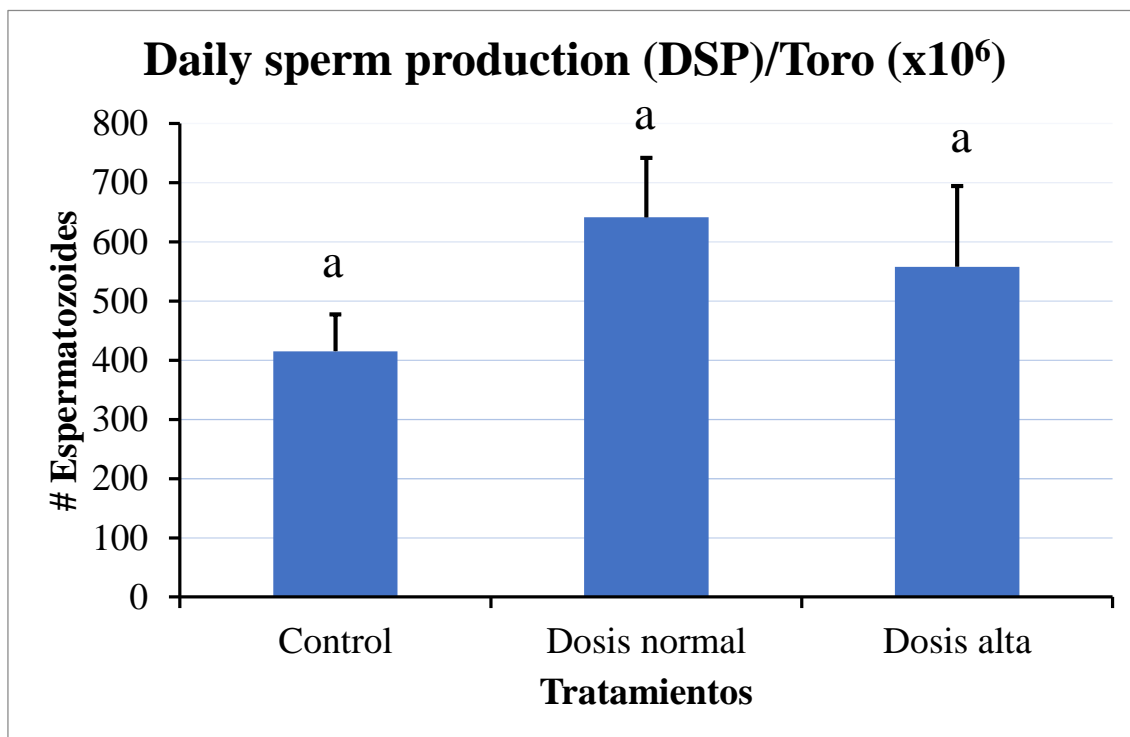


Figura 12. Daily sperm production (DSP)/toro (x10⁶) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 µg/kg p.v.; (T3 Dosis alta) 4 µg/kg p. v.] en toros prepúberes al final del período experimental. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y Las diferentes letras (a-c) en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

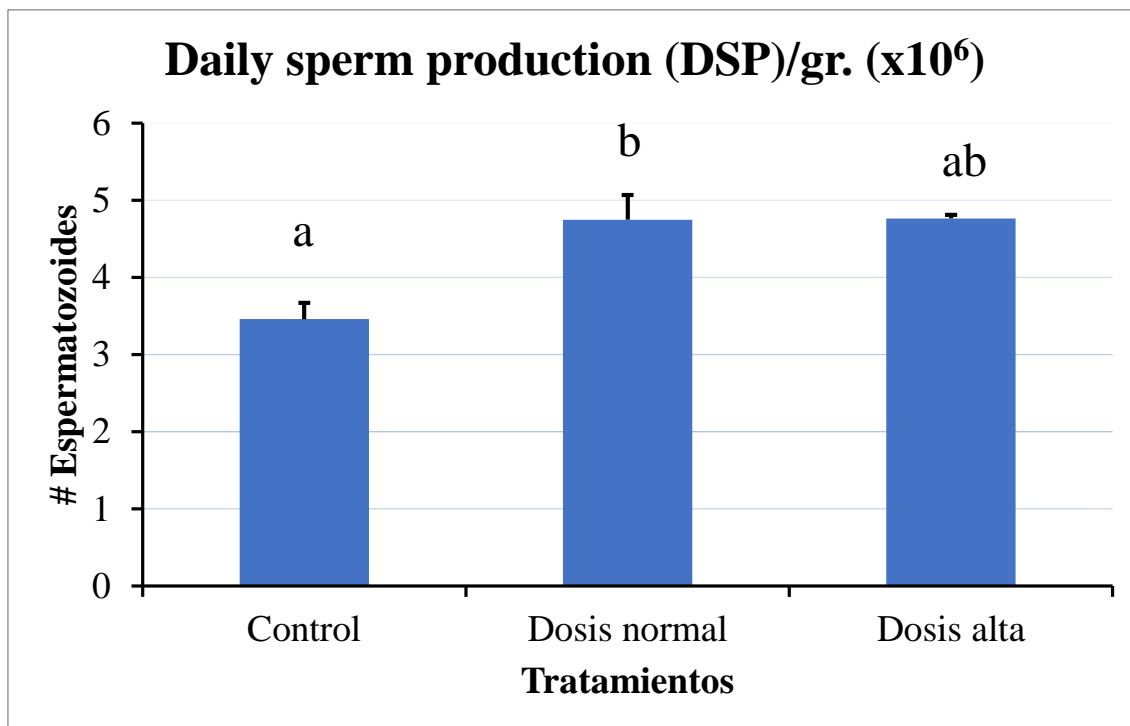


Figura 13. Daily sperm production (DSP)/gr (x10⁶) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, medicamento genérico ICLOS) a diferentes concentraciones.

T1, Control) 1 ml sol. Salina 0,9%; (T2, Dosis normal) 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.; (T3 Dosis alta) 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p. v.] en toros prepúberes al final del período experimental. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y Las diferentes letras (a-c) en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

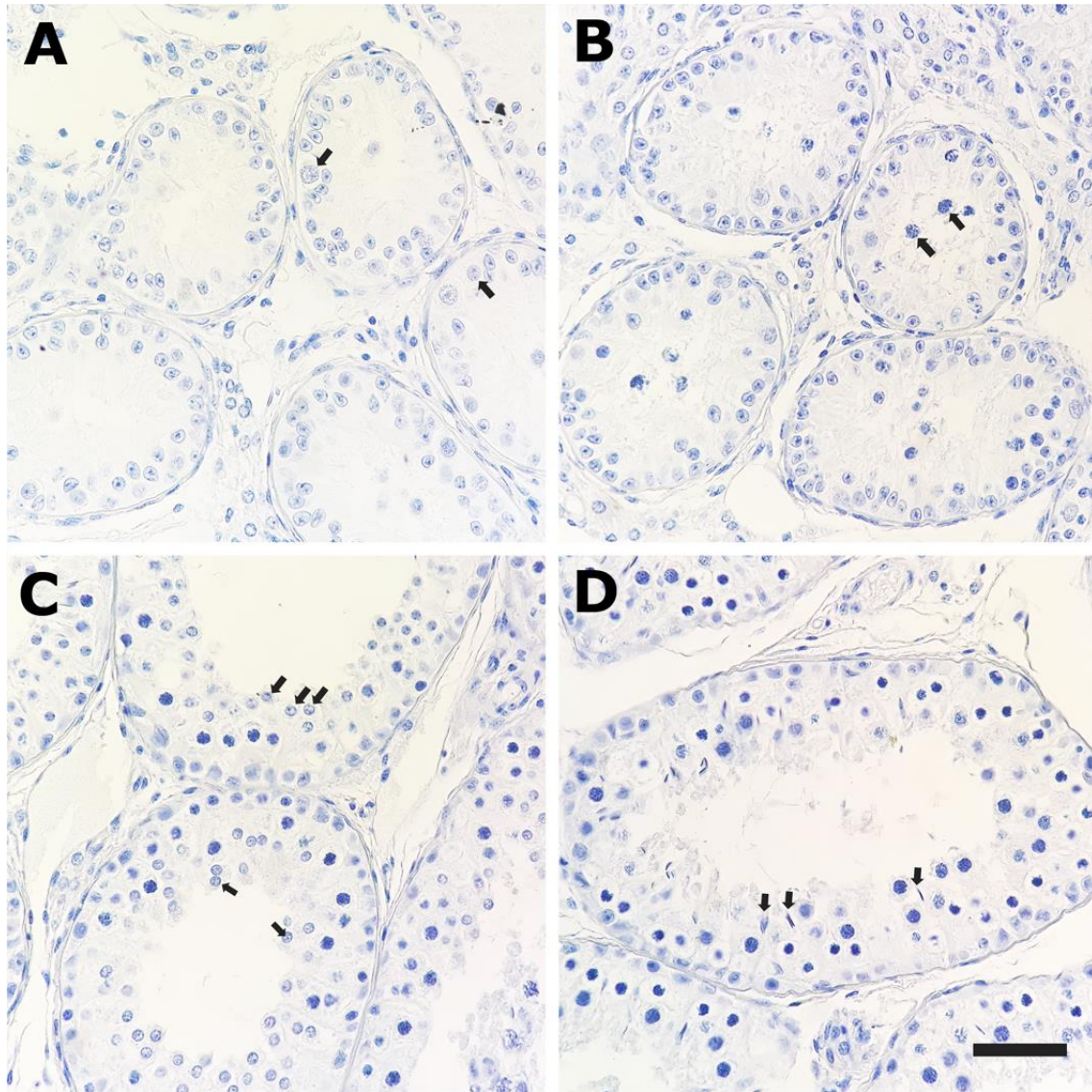


Figura 14. Estado de desarrollo de la espermatogénesis.

A) Estado de desarrollo testicular donde se observa como célula más avanzada a espermatogonias intermedias (→). Esto se encontró en un animal perteneciente al grupo control inicial (Día 0). B) Estado de desarrollo testicular donde se observa como célula más avanzada a: paquiteno (→). Esto se encontró en un animal perteneciente al grupo control inicial (Día 0). C) Estado de desarrollo testicular donde se observa como célula más avanzada a: espermátidas redondas (→). Esto se encontró en animales del grupo control, en un 75% de animales del grupo dosis normal, y en todos los animales del grupo dosis alta (Día 60). D) Estado de desarrollo testicular donde se observa como

célula más avanzada a: espermatidas elongadas (\rightarrow). Esto se encontró en un 25% de animales del grupo dosis normal (Día 60).