

## EFFECTO DE LA APLICACIÓN DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS RECOMBINANTE HUMANO (r-met-hu G-CSF) EN EL DESARROLLO SEXUAL DE CORDEROS PREPÚBERES

### Effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (r-met-hu G-CSF) on sexual development in pre-pubertal ram lambs

M. A. Gutierrez-Reinoso<sup>1</sup>, P. M. Aponte<sup>2</sup>, E. L. Ilbay-Caguana<sup>1</sup>, M. Garcia-Herreros<sup>3\*</sup>

- 1 Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC), Latacunga, Ecuador
- 2 Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Ecuador
- 3 Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Santarém, Portugal

\* Corresponding author:  
Manuel García-Herreros  
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I. P. (INIAV, I.P.), Polo de Santarém, Quinta da Fonte Boa, 2005-048, Santarém, Portugal. Tel.: (+351) 243767 ext. 330.

E-mail:  
herrerosgm@gmail.com

#### ABSTRACT

The main objective of this study was to analyse the effects of r-met-hu G-CSF application as an inductor of early sexual development in prepubertal ram lambs. 20 Corriedale ram lambs (age= 2 months; ~18 kg l.w.) were divided in 4 groups: a control group (T1; n= 5) and 3 treated groups (T2, T3 and T4; n= 5 each) were administered a subcutaneous injection of r-met-hu G-CSF/Filgrastim daily for 4 consecutive days [(T2; 1 µg/kg l.w.; 18 µg/day; total= 72 µg), (T3; 10 µg/kg l.w.; 180 µg/day; total= 720 µg) y (T4; 20 µg/kg l.w.; 360 µg/day; total= 1.440 µg)]. A haematological analysis (white blood cells) was performed to determine the response of the spinal cord and confirm the hematopoietic effect of r-met-hu G-CSF. The testis weight, testicular morphometry and testicular volume were evaluated as well. To determine the effectiveness of the r-met-hu G-CSF treatment on sexual development, histological alterations (seminiferous tubules, Sertoli cells, gonocytes, spermatogonia, among others) were also evaluated as well as the endocrine response (FSH, LH, testosterone and cortisol) by ELISA. Significant differences were found in the number of leukocytes between the T4 vs. T1, T2 and T3 groups, from day 3 onwards (p<0.05). Lymphocyte percentage was significantly higher in T3 and T4 (p<0.05) compared to control (T1) and T2 from day 2 onwards. In addition, significant differences were observed in the testicular weight between the T1/T2 and the T3/T4 groups (p<0.05), as well as between the T1 and the T3/T4 regarding testicular volume (p<0.05). The hormone levels differed significantly in FSH concentration obtained in T3 compared to the other groups from day 3 onwards (p<0.05). Regarding LH and testosterone, significant differences were found between the T4 and the rest of the groups, which were evident from day 2 (LH) and day 3 (testosterone) (p<0.05). The cortisol did not differ among groups (p>0,05). With regard to histological alterations, T3 showed a more advanced cellular profile presenting primary spermatocytes, while T4 reached the generation of round spermatids. In conclusion, the application of r-met-hu G-CSF (Filgrastim) as a stimulating factor for early sexual development affected fast and positively the white blood cells' haematopoiesis and the hormonal activity when applied at high concentrations, and accelerated the testicular development in prepubertal lambs, affecting not only endocrine hormone levels but also the testicular weight and volume, as well as the spermatogenic process.

**Keywords:** r-met-hu G-CSF, testicular histopathology, sexual development, hormonal profile, ovine

#### RESUMEN

El principal objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de la aplicación de r-met-hu G-CSF como inductor al desarrollo sexual temprano en corderos prepúberes. Se utilizaron 20 corderos de la raza Corriedale (edad: 2 meses; ~18 kg p.v.) divididos en 4 grupos: grupo control (T1; n= 5) y 3 grupos tratados (T2, T3 y T4; n= 5 cada uno) con una dosis diaria de r-met-hu G-CSF/Filgrastim durante 4 días consecutivos [(T2; 1 µg/kg p.v.; 18 µg/día; 72 µg totales), (T3; 10 µg/kg p.v.; 180 µg/día; 720 µg totales) y (T4; 20 µg/kg p.v.; 360 µg/día; 1.440 µg totales)]. Se realizó un análisis hematológico (serie blanca) para determinar la respuesta de la médula espinal y confirmar la acción hematopoyética del r-met-hu G-CSF. Se evaluó el peso y la morfometría testicular, y a su vez, a partir de ésta, se determinó el volumen testicular. También se

evaluaron las alteraciones histológicas (túbulos seminíferos, células de Sertoli, gonocitos y espermatogonias, entre otras) así como la respuesta endocrina (FSH, LH, testosterona y cortisol plasmáticos) mediante test ELISA. A partir del día 3 post-tratamiento se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de glóbulos blancos totales entre el T4 vs. T1, T2 y T3 ( $p < 0,05$ ). Al segundo día post-tratamiento el porcentaje de linfocitos fue significativamente mayor en T3 y T4 ( $p < 0,05$ ) con respecto al control (T1) y T2. Además, se observaron diferencias significativas en cuanto al peso testicular entre T1/T2 y T3/T4 ( $p < 0,05$ ), así como entre T1 y T3/T4 respecto al volumen testicular ( $p < 0,05$ ). Los niveles hormonales, difirieron significativamente en la concentración de FSH obtenida en el T3 con respecto a los demás grupos a partir del día 3 de iniciados los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Respecto a la LH y testosterona, se encontraron diferencias significativas entre T4 y el resto de los grupos, las cuales fueron evidentes a partir del día 2 (LH) y del día 3 (testosterona) post-tratamiento ( $p < 0,05$ ). El cortisol no difirió significativamente entre los grupos analizados ( $p > 0,05$ ). Respecto a las alteraciones histológicas, T3 presentó un perfil celular más avanzado con espermatoцитos primarios, mientras que T4 alcanzó la generación de espermátidas redondas. En conclusión, la aplicación del r-met-hu G-CSF (Filgrastim) como factor estimulante del desarrollo sexual afectó rápida y positivamente la hematopoyesis de la serie blanca y sobre la actividad hormonal cuando se suministró a altas concentraciones y aceleró el desarrollo testicular en corderos prepúberes, afectando no solo a los niveles hormonales endocrinos sino también al peso y volumen testicular, así como al proceso espermatogénico.

**Palabras clave:** r-met-hu G-CSF, histopatología testicular, desarrollo sexual, perfil hormonal, ovino.

## INTRODUCCION

La espermatogénesis es un proceso fisiológico y bioquímico complejo, en el que las espermatogonias tras diferentes fenómenos de proliferación y diferenciación (incluyendo mitosis, meiosis, y espermiogénesis), darán lugar finalmente a los espermatozoides (Aponte et al., 2017). Para que el proceso de espermatogénesis se lleve a cabo de manera normal, la interacción entre las células de Sertoli y las espermatogonias es fundamental. En el período prepuberal se produce el inicio de la espermatogénesis a partir del epitelio germinal y bajo la influencia de varias hormonas (LH y FSH entre otras) (Gutiérrez-Reinoso et al., 2017). Cuando los espermatozoides comienzan a aparecer en el lumen de los túbulos seminíferos se considera que el individuo llega a un estado de desarrollo sexual denominado pubertad (Aponte et al., 2017). Tras varios ciclos de mitosis, los espermatoцитos pasarán por un proceso de meiosis, durante el cual el material genético disminuye transformándose finalmente en espermátidas elongadas. Este proceso se caracteriza por el aumento del número de células, especialmente a nivel de los túbulos seminíferos (Gutiérrez-Reinoso et al., 2017). Estudiar esta fase del desarrollo sexual (prepuberal) y el papel fisiológico que tienen los diferentes factores espermatogénicos es importante para determinar la función reproductiva adulta en las diferentes especies de animales domésticos (Aponte et al., 2017).

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es un miembro de la familia de los factores de crecimiento hematopoyéticos (Bendall y Bradstock, 2014). El r-met-hu G-CSF no glicosilado, conocido comercialmente como Filgrastim, ha sido utilizado con éxito para estimular la proliferación y la maduración de células hematopoyéticas (Dale et al., 2017). Sin embargo, el papel fisiológico del r-met-hu G-CSF en otros tejidos no hematopoyéticos, tales como el tejido testicular, así como su efecto en la proliferación y diferenciación de las células que lo componen es una incógnita. La posibilidad de utilizar r-met-hu G-CSF para acelerar el desarrollo sexual mediante el estímulo de la proliferación células madre testiculares abre nuevos caminos para el aumento de los beneficios en la industria animal (Benavides-García et al., 2015). Llegar a la pubertad a una edad más temprana, permitiría realizar una anticipación en la selección genética de los animales antes de lo habitual, y este hecho tiene un

importante interés desde el punto de vista económico y genético (Ercambrack y Knight, 1998; Valasi et al., 2012). En primer lugar, debido a que permitiría aumentar la vida productiva del animal, lo que permitiría reducir los costes derivados de la manutención de los sementales. En segundo lugar, porque el uso temprano de sementales de mérito genético superior reduciría los costos notablemente debido a que permite que los intervalos de tiempo inter-generacional disminuyan y por tanto que aumenten las ganancias derivadas de una mejora genética temprana (Loaiza-Echeverri et al., 2013). Además, existen otras ventajas derivadas de un desarrollo sexual temprano, debido a que los machos jóvenes son generalmente más fáciles de manejar, tienden a aprender más rápido, tienen una condición corporal más adecuada y suelen tener una mayor libido en comparación con los sementales más maduros (Loaiza-Echeverri et al., 2013).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente y para obtener una visión más ampliada y detallada sobre la posible función de la aplicación del G-CSF y su impacto en la función sexual, el objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de la aplicación del r-met-hu G-CSF con el fin de estudiar su efecto en el desarrollo sexual mediante la monitorización de la morfometría testicular, el desarrollo del tejido testicular (histología del ciclo espermatogénico) y los perfiles hormonales (FSH, LH, testosterona y cortisol) y hematológicos, tomando como modelo animal el ovino (corderos prepúberes).

## MATERIAL Y METODOS

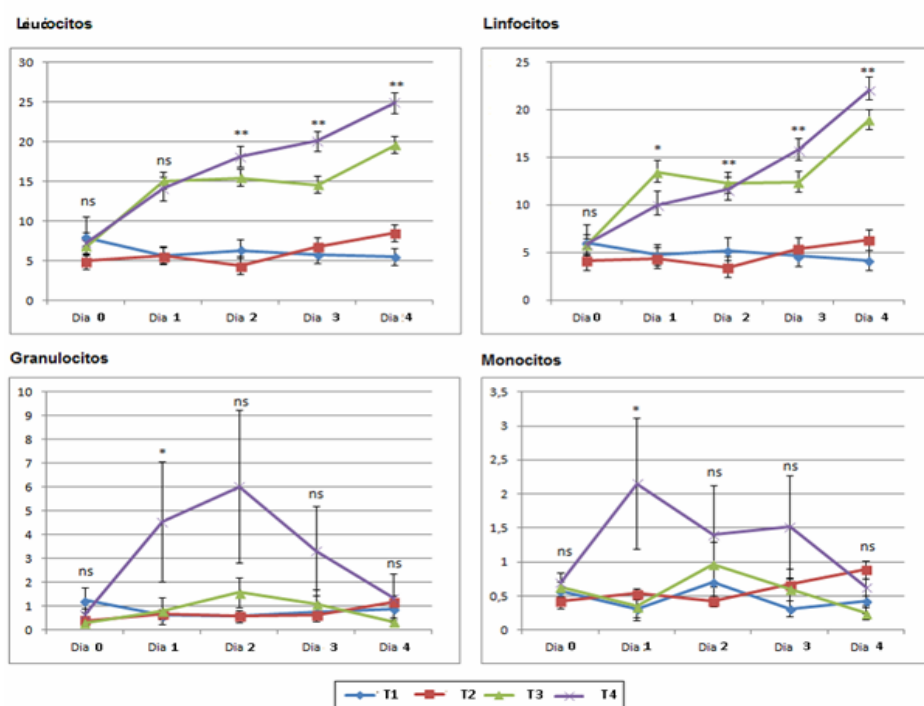
En el presente estudio se utilizaron 20 corderos de raza Corriedale (edad: ~2 meses; P.V.: 18 kg) ubicados en el cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, Ecuador (latitud: 01° 38' 51" S; longitud: 78° 40' 59" O; altitud: ~2.754 m.s.n.m.). Los animales se sometieron a un exhaustivo control sanitario verificando la ausencia de cualquier tipo de patología. Los animales se dividieron en 4 grupos. El primero (n= 5) se utilizó como grupo control (T1) al cual se le inyectó diariamente solución fisiológica, y a los 3 restantes grupos (T2, T3 y T4; n= 5 cada uno) se les aplicó una dosis diaria de Filgrastim (r-met-hu G-CSF; Filgen®, Bioprofarma, Buenos Aires, Argentina) durante 4 días consecutivos [(T2; 1 µg/kg p. v.; 18 µg/día; 72 µg totales), (T3; 10 µg/kg p. v.; 180 µg/día; 720 µg totales)

y (T4; 20 µg/kg p. v.; 360 µg/día; 1.440 µg totales)]. Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular (5 mL diariamente durante los 5 primeros días) para la determinación del perfil hematológico y hormonal. La primera muestra se tomó un día antes del comienzo del experimento para tener una referencia del perfil plasmático hormonal y sanguíneo en todos los grupos. A partir de estas muestras se realizaron análisis hematológicos para determinar la respuesta de la médula espinal y confirmar la acción del r-met-hu G-CSF. Para ello se analizaron mediante el equipo de análisis hematológico HumaCount 30TS® (Human GmbH, Wiesbaden, Alemania) las células de la serie blanca (leucocitos, linfocitos, granulocitos y monocitos). Los estudios hormonales se realizaron mediante la técnica de ELISA indirecto (Abnova, Taipei, Taiwan) para la determinación de los niveles plasmáticos de las hormonas FSH, LH, Testosterona y Cortisol para determinar los niveles de estrés durante el desarrollo de los experimentos. Además, simultáneamente a las muestras de sangre tomadas, se realizaron mediciones de la morfología testicular de cada uno de los individuos de ambos grupos (longitud y anchura de los testículos).

Finalmente, aproximadamente a los 60 días después de la última aplicación del r-met-hu G-CSF (~ 4 meses de edad) todos los animales fueron esterilizados quirúrgicamente independientemente del grupo al que pertenecían. Los testículos fueron mantenidos en hielo (-4°C aprox.) antes de ser procesados para el análisis histológico. Después de retirar la túnica vaginalis y el epidídimo, se evaluó el peso y el volumen testicular utilizando el método del desplazamiento de agua utilizando una probeta graduada. Muestras de tejido testicular (aprox. 0,5 cm<sup>3</sup>) fueron fijadas en 4% de formaldehído durante 48h para finalmente ser almacenadas en etanol al 70% (4 °C). Las muestras se procesaron mediante una serie de pasos de deshidratación en etanol al 70% (30 min x 2), etanol al 96% (30 min x 2), etanol al 100% (30 min x 2), xileno (45 min x 2) y finalmente se realizó una infiltración de parafina en un procesador de muestras para histología (Slee MTM, Mainz, Alemania). Una vez que la parafina quedó solidificada se

realizaron cortes de 5 µm de espesor mediante un micrótopo (Cut 6062, Slee, Mainz, Alemania). A continuación, las muestras fueron desparafinizadas, teñidas con Hematoxilina de Harris y montadas mediante bálsamo de Canadá (Biopack, Buenos Aires, Argentina). El tejido testicular se analizó en términos de morfología general, estereología y parámetros morfológicos específicos. Las imágenes fueron tomadas con una videocámara (Tucsen Imaging Technology Co., Ltd, Beijing, China) para su posterior análisis. La densidad de volumen de los compartimentos testiculares (túbulos seminíferos y los espacios intersticial e intertubular) fueron estimados a partir de una grátula de 30 puntos (separación entre puntos de 195-µm) superpuesta de forma digital de forma aleatoria sobre imágenes tomadas del tejido testicular correspondientes a los tratamientos llevados a cabo. Se tomaron un total de 20 imágenes por muestra contando en cada una de ellas 600 puntos específicos. El diámetro de los túbulos seminíferos se realizó a partir de mediciones digitales siendo calculado como la media entre los ejes mayor y menor de cada túbulo elegido aleatoriamente. Los diámetros tubulares (aprox. 55 por muestra) fueron medidos y evaluados mediante el software Image-J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). La determinación del estadio de desarrollo espermatogénico (espermatogénesis) en los túbulos que mostraron presencia de espermatozoides se realizó según la metodología llevada a cabo en ovino por Bilaspuri y Guraya (1986).

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la utilización del software SPSS v. 17 para Windows. Tras una previa exploración de los datos, se procedió a la aplicación del test ANOVA de una vía para la comparación de las medias obtenidas a partir de los análisis estereológico y morfométrico. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas se llevaron a cabo análisis estadísticos basados en comparaciones múltiples mediante el test post hoc de Bonferroni.



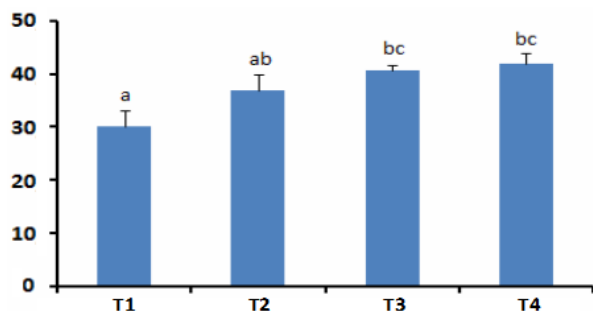
**Figura 1. Parámetros hematológicos de la serie blanca tras la aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, Filgen®) a diferentes**

**concentraciones** [(T1, Control); (T2) 1 µg/kg pv.; 18 µg/día; 72 µg totales; (T3) 10 µg/kg p. v.; 180 µg/día; 720 µg totales y (T4) 20 µg/kg p. v.; 360 µg/día; 1.440 µg totales] en corderos prepúberes durante los días del tratamiento. Valores métricos hematológicos [Leucocitos (x 10<sup>9</sup> cel./L); Linfocitos (x 10<sup>9</sup> cel./L); Granulocitos (%) y Monocitos (%)]. ns: no significativo; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

## RESULTADOS

Como se observa en la Figura 1, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de leucocitos entre T4 y T1, T2 y T3, a partir de las 48 h (día 2) de iniciado el tratamiento ( $p < 0,05$ ). De forma similar, el porcentaje de linfocitos fue significativamente mayor en los grupos T3 ( $p < 0,05$ ) y T4 ( $p < 0,01$ ) con respecto al grupo control (T1) y al grupo T2 a partir de las 24 h (día 1). Entre el grupo control y T2, no hubo diferencias estadísticamente significativas respecto a la cantidad total de leucocitos y linfocitos independientemente del día del tratamiento ( $p > 0,05$ ). Respecto al porcentaje de granulocitos y monocitos, hubo diferencias significativas en el grupo T4 con respecto al resto de grupos ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, esta diferencia dejó de ser significativa a partir del día 1 de tratamiento. No hubo diferencias significativas respecto al porcentaje de granulocitos y monocitos entre los tratamientos T1, T2 y T3 independientemente del día de tratamiento ( $p > 0,05$ ).

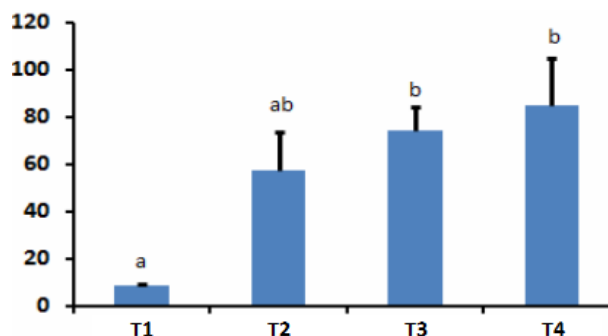
A continuación, en la Figura 2 se muestran los resultados del parámetro peso testicular obtenido en el presente estudio:



**Figura 2. Peso testicular (g) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, Filgen®) a diferentes concentraciones [Control (T1); 1 µg/kg p. v.; 18 µg/día; 72 µg totales(T2); 10 µg/kg p. v.; 180 µg/día; 720 µg totales(T3) y 20 µg/kg p. v.; 360 µg/día; 1.440 µg totales(T4)] en corderos prepúberes**

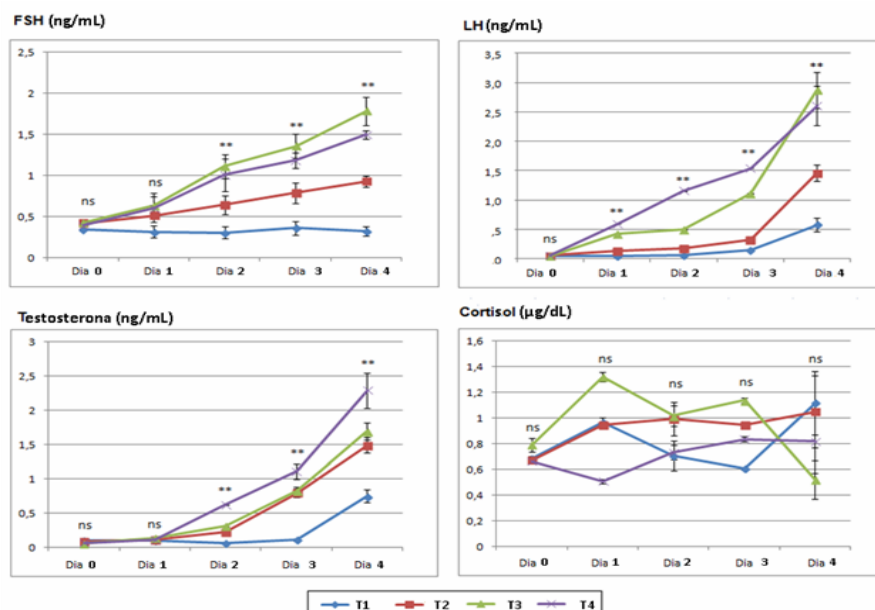
al final del período experimental. Las diferentes letras (a-c) en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ( $p \leq 0,05$ ). Edad de los animales al final del período experimental = ~ 4 meses.

En la figura 2, se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto al peso testicular entre los T1/T2 y T3/T4 ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre T1 y T2 ( $p > 0,05$ ) y tampoco entre T3 y T4 ( $p > 0,05$ ).



**Figura 3. Volumen testicular (cm³) post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, Filgen®) a diferentes concentraciones [Control (T1); 1 µg/kg p. v.; 18 µg/día; 72 µg totales(T2); 10 µg/kg p. v.; 180 µg/día; 720 µg totales(T3) y 20 µg/kg p. v.; 360 µg/día; 1.440 µg totales(T4)] en corderos prepúberes al final del período experimental. Las diferentes letras (a-b) en cada barra indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ( $p \leq 0,05$ ). Edad de los animales al final del período experimental = ~ 4 meses.**

En la figura 3, se presenta diferencias estadísticamente significativas en cuanto al volumen testicular entre T1 y T3/T4 ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control (T1) y T2 ( $p > 0,05$ ) y tampoco entre los grupos T3 y T4 ( $p > 0,05$ ).



**Figura 4. Concentraciones hormonales post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, Filgen®) a diferentes concentraciones [Control (T1); 1 µg/kg p. v.; 18 µg/día; 72 µg totales(T2); 10 µg/kg p. v.; 180 µg/día; 720 µg totales (T3) y 20 µg/kg p. v.; 360 µg/día; 1.440 µg totales(T4)] en corderos prepúberes durante los días del tratamiento. Se tomaron muestras de sangre de todos los individuos (n=20) para realizar los diferentes análisis hormonales. Concentraciones hormonales [FSH (ng/mL); LH (ng/mL); Testosterona (ng/mL) y Cortisol (µg/dL)]. ns: no significativo; \*\*  $p < 0,01$ .**



En la figura 4, se observan las diferencias estadísticamente significativas en la concentración de FSH en T3 con respecto a T1, T2 y T4, a partir del día 3 del tratamiento ( $p < 0,05$ ). En el caso de las concentraciones obtenidas respecto a las hormonas LH y testosterona sérica, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el T4 y el resto de los grupos, las cuales fueron evidentes a partir del día 2 en cuanto a la LH y del día 3 en cuanto a la testosterona ( $p < 0,05$ ). Finalmente, respecto al cortisol, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos ( $p > 0,05$ ).

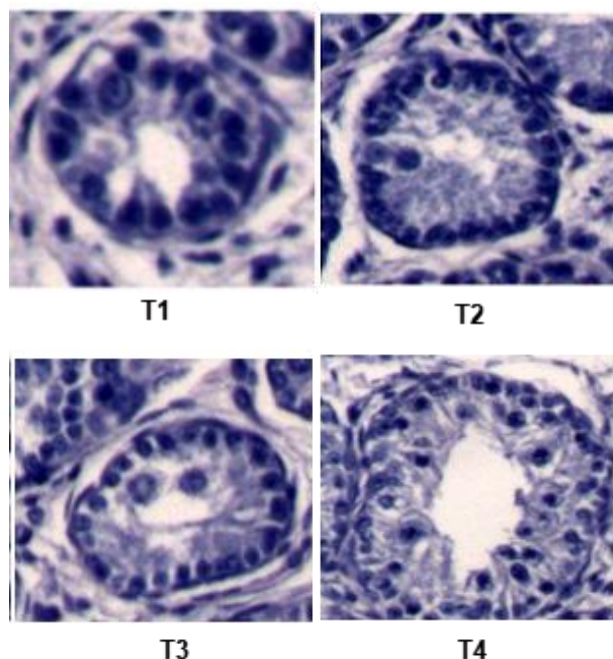


Figura 5. Micro-morfología testicular (túbulos seminíferos) obtenida mediante muestras histológicas post aplicación de r-met-hu G-CSF (Filgrastim, Filgen®) a diferentes concentraciones [Control (T1); 1 µg/kg p. v.; 18 µg/día; 72 µg totales (T2); 10 µg/kg p. v.; 180 µg/día; 720 µg totales (T3) y 20 µg/kg p. v.; 360 µg/día; 1.440 µg totales (T4)] en corderos prepúberes al final del período experimental.

En la Figura 5, se muestran imágenes histológicas con las características estructurales del tejido testicular post aplicación de los diferentes tratamientos. Todos los animales tenían un perfil celular típico para su edad (2 meses) al comienzo de los experimentos (testado inicialmente mediante esterilización quirúrgica de 3 animales y posterior análisis histológico de muestras de tejido testicular), es decir, túbulos seminíferos sin lumen formado, con células de Sertoli y gonocitos en posición central, rodeados de células peritubulares mioideas conspicuas. A los dos meses de comenzado los tratamientos (4 meses de edad) los túbulos seminíferos de los animales del grupo control apenas habían comenzado la primera onda de espermatogénesis. Los animales del grupo T2 habían comenzado la espermatogénesis con la presencia de células espermatogoniales en el compartimento basal. Los animales del grupo T3 presentaron como tipo celular más avanzado espermatoцитos primarios mientras que el grupo T4 habían logrado avanzar hasta la generación de espermátidas redondas acelerando así la aparición y desarrollo de la espermatogénesis en ovinos prepúberes.

## DISCUSIÓN

El control de la actividad reproductiva, así como las ventajas derivadas de ésta, han sido objeto de estudio en numerosas ocasiones, lo que ha permitido descubrir nuevas estrategias para optimizar el manejo y la productividad en animales domésticos (Shelton, 1990; Thundathil et al., 2016). Así, la aceleración del desarrollo sexual puede ser considerada una herramienta muy interesante a la hora de rentabilizar los costos derivados de la manutención de animales destinados a reproductores (Talahah y Ababneh, 2011).

Por otro lado, las ventajas que este hecho, entre otras, conlleva una aceleración sustancial en la inclusión de nuevo material genético para la mejora de la productividad, ya sea cárnica o lechera, justificando ampliamente la labor de estudio realizada en esta área (Adams, 2005; Thundathil et al., 2016). Además, como consecuencia de este hecho, la reducción del tiempo inter-generacional y el aumento de la longevidad productiva se torna evidente, lo cual repercute directamente en los beneficios obtenidos a medio y largo plazo por parte del productor (De Vries, 2017; Weller et al., 2017). La utilización del r-met-hu G-CSF para realizar estudios fisiológicos se ha llevado a cabo fundamentalmente en seres humanos, aunque existen algunos estudios en diferentes especies de animales domésticos tales como en equino (Ho et al., 2014; Endo et al., 2015), porcino (Moroni et al., 2013; Sanzari et al., 2015) e incluso en murino (Vacek et al., 2005). Sin embargo, en todos los trabajos llevados a cabo en animales domésticos nunca se ha investigado el efecto de la aplicación del r-met-hu G-CSF en el desarrollo sexual de éstos. El único trabajo que se ha llevado a cabo con anterioridad en la especie ovina (*Ovis aries*) usando r-met-hu G-CSF tampoco se centró en el estudio del efecto producido tras su aplicación en el desarrollo sexual (Juthier et al., 2006).

En el presente estudio hemos utilizado animales prepúberes cuyo desarrollo a nivel gonadal aún no alcanza una funcionalidad completa. Los resultados obtenidos evidenciaron que hubo un efecto dosis-dependiente en cuanto a la activación y aceleración del proceso espermatogénico, así como un incremento de la actividad hormonal a nivel plasmático de la FSH, LH y testosterona, especialmente a las dosis más altas. A diferencia del efecto del r-met-hu G-CSF (Filgrastim) sobre el tejido hematopoyético, el cual puede ser estimulado desde las dosis menos elevadas, el efecto obtenido a nivel del tejido testicular derivado de las dosis más elevadas puede deberse a factores intrínsecos (fisiología diferencial entre tejidos con diferentes funciones) que aumentarían la actividad del proceso espermatogénico solamente a partir de un umbral de concentración del r-met-hu G-CSF. Contrariamente, se observó que la liberación de cortisol sucedió de manera aleatoria independientemente de la dosis de r-met-hu G-CSF utilizada, lo cual indicaría que el Filgrastim no tiene un efecto dosis-dependiente en el caso de la posible estimulación a nivel del tejido suprarrenal, a su vez directamente estimulado por la producción de ACTH (Enyeart, 2005). La obtención de estos resultados, demuestran una uniformidad de respuesta hormonal la cual no se encuentra afectada por variaciones inter-individuales derivadas de la alimentación (Guan y Martin, 2017) o el ambiente (Bujan, 1998) ya que los ensayos fueron estrictamente controlados durante todo el período experimental.

Por otro lado, se produjeron cambios acentuados a nivel macro-morfológico testicular (peso y volumen) entre los diferentes grupos estudiados. Especialmente estos cambios fueron más relevantes a las dosis más altas (T3 y T4) mostrando evidencias de que a dichas dosis se produjo una aceleración

del proceso fisiológico de la espermatogénesis. A nivel micro-morfométrico podemos observar que los cambios más evidentes a dichas dosis fueron observados respecto al aumento de la actividad espermatogénica a nivel de los túbulos seminíferos. La progresión del desarrollo testicular no fue solamente a nivel local, sino que también se produjo en ambos espacios tubular e intertubular, los cuales sufrieron un considerable aumento en sus dimensiones mostrando de forma evidente que el tratamiento mediante r-met-hu G-CSF a altas dosis induce a una estimulación del desarrollo de la espermatogénesis en corderos prepúberes. De este modo, no podemos descartar un posible estímulo en la liberación de GnRH y el posible aumento de sus receptores a nivel testicular derivados de la estimulación por parte del r-met-hu G-CSF (Filgrastim), los cuales tienen un papel fundamental en el control de la actividad de la esteroidogénesis y como consecuencia en la función espermatogénica (O'Hara y Smith, 2015). Es necesario remarcar que la activación de las diferentes cascadas de la señalización celular a nivel testicular estimuladas, en parte, por las hormonas FSH, LH y testosterona son producidas tras la liberación de la GnRH a nivel del eje hipotálamo-hipofisario, que acelera el proceso de la espermatogénesis, especialmente a nivel de actividad meiótica, lo cual aumenta la estimulación de la onda de producción de espermátidas acentuándola notablemente (Aponte et al. 2017).

Futuros trabajos serán necesarios en relación a los efectos de la aplicación del r-met-hu G-CSF para evaluar la influencia de dicho factor en la producción y calidad de muestras seminales obtenidas a posteriori en corderos maduros sexualmente previamente sometidos a tratamiento. De esta manera, se podrán obtener conclusiones concretas acerca de las ventajas e inconvenientes de la posibilidad de adelantar la edad de la pubertad teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir del seminograma. De esta manera se culminaría el último paso antes de considerar si el r-met-hu G-CSF como un tratamiento eficiente como estimulador del desarrollo sexual temprano en la especie ovina.

## CONCLUSION

En conclusión, los resultados derivados del presente estudio mostraron que la aplicación del r-met-hu G-CSF (Filgrastim) como factor estimulante del desarrollo sexual en corderos prepúberes afectó positivamente a la actividad hormonal y al desarrollo testicular. Sin embargo, la respuesta óptima del r-met-hu G-CSF (Filgrastim) tanto a nivel hematológico como a nivel macro-morfológico e histológico se produjo a las dosis más elevadas, estimulando notablemente el proceso fisiológico de la espermatogénesis y los niveles endocrinos de las hormonas FSH, LH y testosterona en corderos prepúberes.

## CÓDIGO DE ÉTICA

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm)

## AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecer a la Secretaría Nacional de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) del Gobierno de Ecuador por hacer posible el presente trabajo de

investigación a través de su programa Proyecto Prometeo. También nos gustaría agradecer el esfuerzo de todas las personas y laboratorios que hicieron posible la ejecución de la presente investigación.

## CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Todos los autores listados en el presente trabajo han contribuido en la preparación y ejecución de la presente investigación. MG-R, PMA, El-C y MG-H han contribuido en el desarrollo de la metodología. MG-R, PMA y MG-H han contribuido en la concepción y diseño del estudio, la edición del artículo y la supervisión del estudio.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

## REFERENCIAS

- Adams TE. Using gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH analogs to modulate testis function and enhance the productivity of domestic animals. *Anim Reprod Sci.* 2005; 88:127-139.
- Aponte PM, Gutierrez-Reinoso MA, Sanchez-Cepeda EG, Garcia-Herreros M. Active immunization against GnRH in pre-pubertal domestic mammals: testicular morphometry, histopathology and endocrine responses in rabbits, guinea pigs and ram lambs. *Animal.* 2017; 24:1-10. doi: 10.1017/S1751731117002129.
- Benavides-Garcia R, Joachim R, Pina NA, Mutoji KN, Reilly MA, Hermann BP. Granulocyte colony-stimulating factor prevents loss of spermatogenesis after sterilizing busulfan chemotherapy. *Fertil Steril.* 2015; 103:270-280.e8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.023.
- Bendall LJ, Bradstock KF. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014; 25:355-367. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.011.
- Bilaspuri GS, Guraya SS. The seminiferous epithelial cycle and spermatogenesis in rams (*Ovis aries*). *Theriogenology* 1986; 25:485-505.
- Bujan L. Environment and spermatogenesis. *Contracept Fertil Sex.* 1998; 26:39-48.
- Dale DC, Crawford J, Klippel Z, Reiner M, Osslund T, Fan E, Morrow PK, Allcott K, Lyman GH. A systematic literature review of the efficacy, effectiveness, and safety of filgrastim. *Support Care Cancer.* 2017 Sep 22. doi: 10.1007/s00520-017-3854-x.
- De Vries A. Economic trade-offs between genetic improvement and longevity in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2017; 100:4184-4192. doi: 10.3168/jds.2016-11847.
- Endo Y, Hobo S, Korosue K, Ootsuka K, Kitauchi A, Kikkawa R, Hidaka Y, Hagio M, Tsuzuki N. Effects of low-dose G-CSF formulation on hematology in healthy horses after long-distance transportation. *J Vet Med Sci.* 2015; 77:507-509. doi: 10.1292/jvms.14-0586.
- Eneyart JJ. Biochemical and ionic signaling mechanisms for ACTH-stimulated cortisol production. *Vitam Horm.* 2005; 70:265-279.
- Ercanbrack SK, Knight AD. Responses to various selection protocols for lamb production in Rambouillet, Targhee, Columbia, and Polypay sheep. *J Anim Sci.* 1998; 76:1311-1325.

- Gutierrez-Reinoso MA, Aponte PM, Teran-Sinchiguano JA, Garcia-Herreros M. Inmunización activa anti-GnRH en ovino (*Ovis aries*): morfometría testicular, histopatología y respuesta endocrina en corderos prepúberes. *Spermova*. 2017; 1:32-36. doi: 10.18548/aspe/0005.06.
- Guan Y, Martin GB. Cellular and molecular responses of adult testis to changes in nutrition: novel insights from the sheep model. *Reproduction*. 2017; 154:R133-R141. doi: 10.1530/REP-17-0061.
- Ho EN, Kwok WH, Lau MY, Wong AS, Lam KK, Stewart BD, Wan TS. Doping control analysis of filgrastim in equine plasma and its application to a co-administration study of filgrastim and recombinant human erythropoietin in the horse. *J Chromatogr A*. 2014; 1338:92-101. doi: 10.1016/j.chroma.2014.02.064.
- Juthier F, Vincentelli A, Gaudric J, Corseaux D, Fouquet O, Calet C, Le Tourneau T, Soenen V, Zawadzki C, Fabre O, Susen S, Prat A, Jude B. Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization: deleterious effects of granulocyte colony-stimulating factor. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006; 131:843-852.
- Loaiza-Echeverri AM, Toral FL, Bergmann JA, Osorio JP, Carmo AS, Henry M. Selection criteria for sexual precocity in Guzerat bulls raised under grazing conditions. *J Anim Sci*. 2013; 91:4633-4640. doi: 10.2527/jas.2013-6330.
- Moroni M, Ngudiankama BF, Christensen C, Olsen CH, Owens R, Lombardini ED, Holt RK, Whitnall MH. The Gottingen minipig is a model of the hematopoietic acute radiation syndrome: G-colony stimulating factor stimulates hematopoiesis and enhances survival from lethal total-body  $\gamma$ -irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013; 86:986-992. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.04.041.
- O'Hara L, Smith LB. Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015; 29:595-605. doi: 10.1016/j.beem.2015.04.006.
- Sanzari JK, Krigsfeld GS, Shuman AL, Diener AK, Lin L, Mai W, Kennedy AR. Effects of a granulocyte colony stimulating factor, Neulasta, in mini pigs exposed to total body proton irradiation. *Life Sci Space Res (Amst)*. 2015; 5:13-20.
- Shelton JN. Reproductive technology in animal production. *Rev Sci Tech*. 1990; 9:825-845.
- Talafha AQ, Ababneh MM. Awassi sheep reproduction and milk production: review. *Trop Anim Health Prod*. 2011; 43:1319-1326. doi: 10.1007/s11250-011-9858-5.
- Thundathil JC, Dance AL, Kastelic JP. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. *Theriogenology*. 2016; 86:397-405. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.054.
- Vacek A, Hofer M, Schneiderová H, Svoboda J. Ultrafiltered pig leukocyte extract (UPLC, IMUNOR) potentiates hematopoiesis-stimulating effects of G-CSF in vitro and improves the outcome of treatment of hematopoietic radiation damage in mice with G-CSF. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2005; 27:647-659.
- Valasi I, Chadio S, Fthenakis GC, Amiridis GS. Management of pre-pubertal small ruminants: physiological basis and clinical approach. *Anim Reprod Sci*. 2012; 130:126-134. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.01.005.
- Weller JL, Ezra E, Ron M. Invited review: A perspective on the future of genomic selection in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 2017; 100:8633-8644. doi: 10.3168/jds.2017-12879