



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL METAVANADATO DE SODIO EN LA  
MORFOLOGÍA DE LOS MEGACARIOCITOS DEL BAZO EN  
UN MODELO MURINO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

BARBOSA BARRÓN GRECIA FERNANDA



DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. TERESA I. FORTOUL VAN DER GOES  
CIUDAD DE MÉXICO, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1.Datos del alumno  
Apellido paterno  
Apellido materno  
Nombre(s)  
Teléfono  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Carrera  
Número de cuenta

2.Datos del tutor  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

3.Datos del sinodal 1  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

4.Datos del sinodal 1  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

5.Datos del sinodal 1  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

6.Datos del sinodal 1  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

7.Datos del trabajo escrito  
Título

Número de páginas  
Año

1.Datos del alumno  
Barbosa  
Barrón  
Grecia Fernanda  
5517011453  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
312236344

2.Datos del tutor  
Doctora  
Teresa Imelda  
Fortoul  
Van der Goes

3.Datos del sinodal 1  
Doctora  
Patricia  
Rivas  
Manzano

4.Datos del sinodal 2  
Doctora  
Adriana Elizabeth  
González  
Villalva

5.Datos del sinodal 3  
Doctora  
Marcela  
Rojas  
Lemus

6.Datos del sinodal 4  
Doctor  
Mario Agustín  
Altamirano  
Lozano

7.Datos del trabajo escrito  
Efecto del metavanadato de sodio en la morfología de los megacariocitos del bazo en un modelo murino.  
49 pp.  
2020

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi tutora la Dra. Fortoul** por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, abrirme las puertas en su laboratorio y brindarme su apoyo.

**Mtra. Brenda Casarrubias Tabarez** por su ayuda para la realización de este trabajo.

**Dra. Marcela Rojas Lemus, Dra. Nelly López Valdez, Dra. Adriana González** por su ayuda, orientación y consejos.

**Biol. Armando Zepeda y al Biol. Francisco Pasos Nájera** por su colaboración en la toma de microfotografías.

**A la Técnica Académica Raquel Guerrero Alquicira** por su aportación en la técnica histológica.

**A mis amigos y compañeros** del laboratorio de Biología Celular y Tisular: Marisol, Tania, Gaby y Juan.

**A mis padres Francisco y Miriam y mis hermanos Lalo y Maasai** por su apoyo y amor les dedico todo mi esfuerzo y trabajo.

**A mi novio Isaac** por ser mi apoyo y mi calma.

**A mis sinodales.**

Dra. Patricia Rivas Manzano

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

## ÍNDICE

Resumen

Introducción

1. Bazo.....	1
1.1 Megacariocitos.....	2
1.2 Megacariopoyesis.....	3
1.3 Plaquetas.....	6
2. Efecto del vanadio en los megacariocitos.....	7
3. Efecto del vanadio en sangre.....	8
4. Vanadio.....	9
4.1 Vías de Exposición.....	9
4.1.1 Vía inhalada.....	9
4.1.2 Vía dérmica.....	10
4.1.3 Vía oral.....	10
4.2 Toxicocinética del Vanadio.....	11
4.3 Uso Farmacológico del vanadio.....	12
4.4 Metavanadato de Sodio (NaVO <sub>3</sub> ) .....	13
5. Justificación.....	14
6. Hipótesis.....	14
7. Objetivo general.....	14
7.1 Objetivos particulares.....	15
8. Método.....	15
8.1 Método para determinación de dosis.....	15
8.2 Administración.....	15
8.3 Obtención de muestras.....	16
8.4 Hemogramas.....	16

8.5	Conteo y Medición.....	16
8.6	Análisis Estadístico.....	17
9.	Resultados.....	18
9.1	Megacariocitos totales .....	18
9.2	Tamaño de Megacariocitos.....	21
9.3	Lobulación .....	22
9.4	Hemogramas .....	25
9.5	Peso del Bazo .....	26
9.6	Tejido Linfoide .....	27
10.	Resumen de Resultados .....	28
11.	Discusión .....	29
11.1	Efecto en Megacariocitos .....	29
11.2	Efecto en Sangre .....	30
11.3	Efecto en Bazo .....	31
11.3.1	Peso del Bazo.....	31
11.3.2	Pulpa blanca .....	31
12.	Conclusión .....	33
13.	Perspectivas .....	34
14.	Productos del proyecto .....	34
15.	Bibliografía.....	35
16.	Índice de Tablas y Figuras .....	41

## Abreviaturas

ADP	Adenosín Difosfato
ATP	Adenosín Trifosfato
ATPasa	Adenosín Trifosfatasa
AKT	Proteína Cinasa
Mpl	Receptor de Trombopoyetina
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
GPIIb	Glicoproteína IIb Plaquetaria.
IIIa	Inhibidor de Receptor de agregación plaquetaria
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-6,8	Interleucina 6, interleucina 8
JAK	Janus cinasas.
MAPK	Proteínas Cinasas activadas por mitógenos
MK	Megacariocitos
MVS	Metavanadato de Sodio
MVS5	Metavanadato de sodio 5 mg
MVS10	Metavanadato de sodio 10 mg
NaVO <sub>3</sub>	Metavanadato de Sodio
PI3K	Fosfatidilinositol-3-Kinasa
STAT	Proteínas activadoras de señales de transcripción
TPO	Trombopoyetina
UFCM	Unidad Formadora de Colonias Megacariocíticas
vWF	Factor de von Willebrand

## RESUMEN

Los megacariocitos (MK) son los encargados de la producción de plaquetas. Además de la medula ósea en el bazo del ratón los MK maduran y producen plaquetas. Algunos reportes indican que éstos aumentan cuando se exponen a vanadio inhalado. Se desconoce si esto mismo ocurre cuando se administre este elemento por vía oral. La relevancia de esta pregunta se debe a que el Vanadio tiene potencial terapéutico y la vía por la que se administraría es la oral. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto en el bazo del Vanadio por vía oral en un modelo murino.

En este estudio se utilizaron 120 ratones macho CD1 de 30-35g, divididos en tres grupos: Metavanadato de sodio (MVS) 10 mg (n=40), MVS 5 mg (n=40) y control (n=40), el compuesto de vanadio se administró por vía oral (VO) durante 8 semanas. Los animales experimentales se sacrificaron en las semanas 4 y 8 por inyección letal de pentobarbital sódico. Por punción intracardiaca se obtuvo sangre para realizar hemogramas, posteriormente se extrajeron los bazos y se procesaron por la técnica histológica habitual y se tiñeron con H.E. Los cortes histológicos de los bazos se observaron con el microscopio de campo claro y con una reglilla integrada en el ocular se contaron y midieron los megacariocitos de los ratones tratados y los controles para hacer comparaciones entre los tres grupos.

Comparados con los animales del grupo control se observó el aumento en el número y tamaño de los MK en los animales a los que se les administro vanadio en ambas dosis. También se observó el aumento en la lobulación de los núcleos de los MK en los grupos de metavanadato de sodio con respecto al control.



En conclusión, el vanadio aumenta el número, el tamaño y la lobulación en los megacariocitos; Además de aumentar el número de plaquetas en sangre, sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que esto ocurre.

También parece que con el aumento de las dosis de vanadio estas células maduran más rápido. Otra observación es que parece aumentar la cantidad de pulpa blanca. Falta explorar los efectos a largo plazo y comprobar la funcionalidad de las plaquetas.

## **Introducción.**

### **1. Bazo**

El bazo es el órgano linfoide de mayor tamaño, es el responsable de la hematopoyesis en la etapa fetal en humanos y durante toda la vida en ratón además de la médula ósea (Linden *et al*, 2012); en el humano, después de las 28 semanas de gestación la hematopoyesis ocurre solo en la médula ósea.

Este órgano se interpone entre la circulación sistémica y el sistema venoso portal. Histológicamente se divide en pulpa roja y pulpa blanca separados por una zona marginal. En la pulpa blanca se ubican linfocitos T y B, en la pulpa roja se encuentran células como los macrófagos que participan en la destrucción de eritrocitos envejecidos en el bazo de los ratones también se encuentran los megacariocitos que participan en la formación de las plaquetas.

Las funciones del bazo son:

- Filtración de sangre. El bazo forma parte un 25% de todo el sistema fagocítico mononuclear del organismo, filtra constantemente la sangre para eliminar los elementos senescentes del sistema circulatorio, también transforma la hemoglobina en bilirrubina y libera al hierro en la circulación para su reutilización.
- Función inmunológica. El inicio de la respuesta inmunológica y el procesamiento de los antígenos ocurre en la zona marginal del bazo con la formación de anticuerpos de clase IgM e IgG y los macrófagos del bazo son responsables de la fagocitosis de eritrocitos dañados o viejos.
- Función hematológica. Almacena eritrocitos, plaquetas y glóbulos blancos.

Por ser un órgano hematopoyético en el ratón joven, en el bazo se observan megacariocitos y otras células sanguíneas. (Motta-Ramírez *et al*, 2016; Rabaza *et al*, 2010).

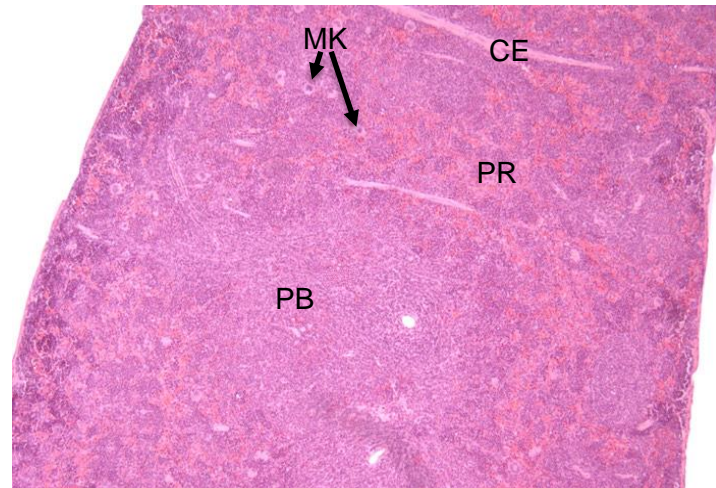


Figura 1. Corte histológico del bazo. Se observan la pulpa blanca (PB), la pulpa roja (PR), los megacariocitos (MK) y los cordones esplénicos (CE). Elaboración propia.

### 1.1 Megacariocitos.

Los megacariocitos (MK) son células que miden de 20 a 150  $\mu\text{m}$  de diámetro, se originan en los órganos hematopoyéticos a partir de unidades formadoras de colonias Megacariocíticas (UFCM) procedentes de las unidades multipotenciales mieloides. Las UFCM hacen mitosis y se diferencian en promegacarioblastos que se diferencian a megacarioblastos



Figura 2. Microfotografía de un Megacariocito. Elaboración propia.

cuyo núcleo ya es lobulado, para después dar origen a los megacariocitos (Contreras-Villa, 2013) los cuales tienen un solo núcleo multilobulado

y poliploide (cada lóbulo es  $2n$ ), ya que llevan a cabo un proceso llamado **endomitosis** que consiste en que la célula duplica su material genético sin división nuclear ni celular por consecuencia se hace más grande y aumenta la cantidad de citoplasma de ahí su nombre etimológico *mega* “grande”, y *karion* “núcleo”.

Al multiplicar su cantidad de citoplasma como resultado de la endomitosis, el citoplasma madurará, esto se refiere a que se producirán proteínas y se almacenarán en forma de gránulos, que como resultado de los procesos de demarcación y fragmentación plaquetaria se desprenderán junto con una parte del citoplasma y envueltos por membrana, dando lugar a las plaquetas, las cuales son muy importantes ya que forman parte del equilibrio hemostático. El núcleo multilobulado de los megacariocitos, por la endomitosis, se va compactando y después de liberar las plaquetas, se considera que el megacariocito ya cumplió su función y sus restos son eliminados por fagocitosis. (González-Villalva *et al.* 2018).

## 1.2 Megacariopoyesis

La megacariopoyesis es un proceso para la proliferación, diferenciación y maduración de los megacariocitos para la generación de plaquetas, las cuales tienen un papel fundamental en la hemostasia, la principal hormona reguladora de la megacariopoyesis y producción plaquetaria es la Trombopoyetina (TPO) (Heller,2017).

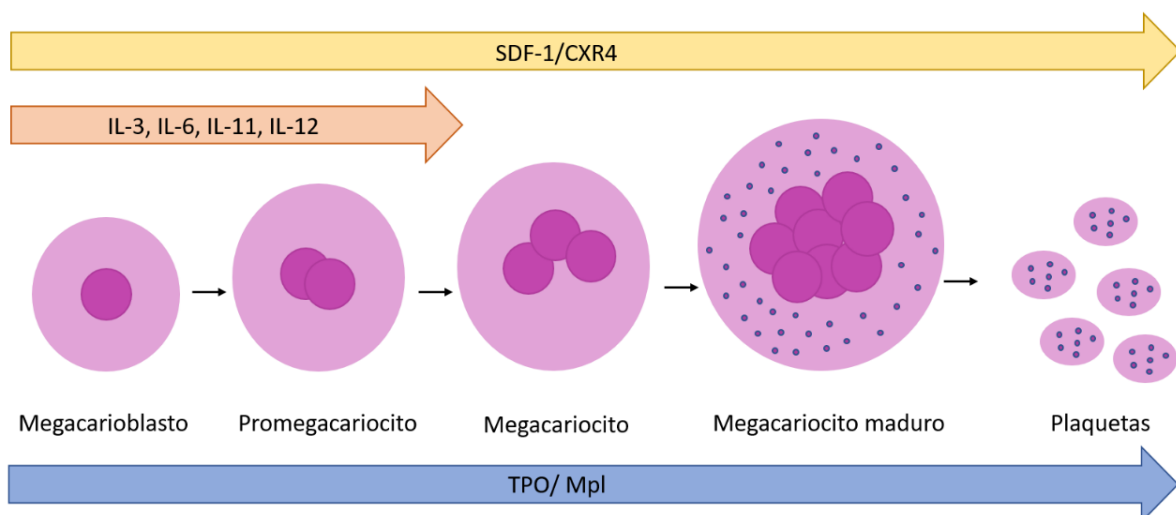


Figura 3. Citocinas y quimiocinas activadoras del proceso de maduración y diferenciación de los megacariocitos en cada una de las etapas de maduración de los megacariocitos. Fuente: González-Villalva *et al.*, 2010.

La TPO es el estímulo más potente de las células formadoras de colonias de megacariocitos, y es una de las dos únicas hormonas no redundantes que afectan la supervivencia y expansión de las células madre hematopoyéticas (Kaushansky, 2016).

La Trombopoyetina es un factor de crecimiento hematopoyético importante; se sintetiza principalmente en el hígado y el riñón donde su producción es constitutiva y no aumenta ni disminuye ante los cambios en el número de plaquetas; además se transfiere a la circulación sin acumulación aparente. Los niveles de TPO en sangre y médula ósea son inversamente proporcionales a la cuenta plaquetaria. Los niveles de Trombopoyetina son regulados, principalmente por la unión a su receptor Mpl, su internalización y destrucción. Existen receptores Mpl tanto en los megacariocitos como en las plaquetas circundantes. La unión de TPO a su receptor Mpl activará las vías JAK y STAT que promueven el crecimiento celular (González -Villalva *et al*, 2010).

Además de la vía JAK/STAT la TPO activa la vía de MAPK, lo que potencia la maduración de los megacariocitos. La unión a TPO produce mitosis, endomitosis, maduración y una gran variedad de efectos antiapoptóticos en los precursores de megacariocitos y megacariocitos. El receptor de Trombopoyetina está presente en una amplia variedad de células y tejidos. En la megacariopoyesis se encuentra desde las células formadoras de colonias de megacariocitos, progenitores mieloides y eritroides, hasta en megacariocitos tempranos y tardíos, así como en plaquetas. (Kutter,2013).

Además de la TPO, son importantes la IL3, IL6 e IL 11 en la megacariopoyesis independiente de TPO, utilizando vías de señalización dependientes de la glucoproteína 130 (Gp130), ya que promueven la maduración y proliferación de

megacariocitos (IL 6 y IL 11) y aumentan los efectos de la IL3 y la TPO. Estas citocinas participan en la modificación del citoesqueleto de los megacariocitos para la liberación de plaquetas (González-Villalva, *et al.* 2010).

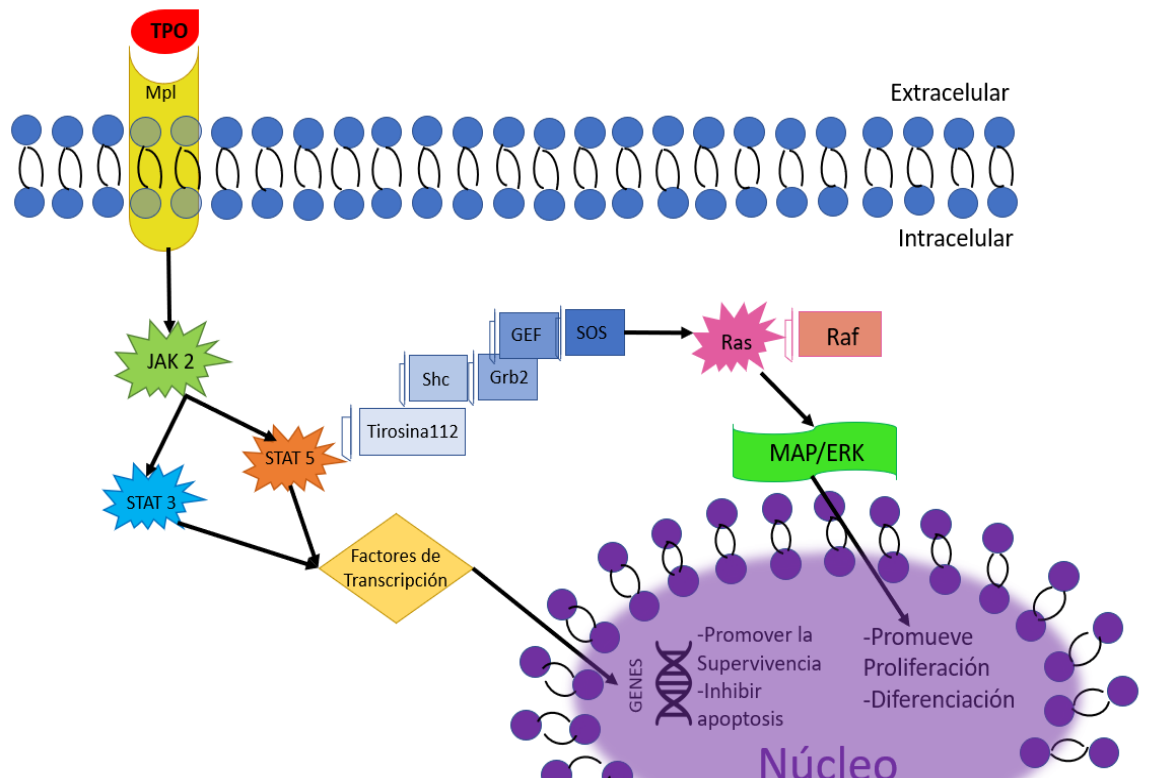


Figura 4. Vías de Señalización. Al unirse la TPO a Mpl, éste se dimeriza y JAK2 se transfosforila y fosforila a STAT3 y STAT5 que se unen a las tirosinas 112 y 117. STAT3 y STAT5 fosforiladas forman homodímeros y se translocan al núcleo para servir como factores de transcripción que activan genes que promueven la supervivencia e inhiben la apoptosis. También el adaptador Shc se une a la tirosina-112 Grb2 fosforilada, que junto con GEF y SOS activan a Ras. La activación de Ras lleva al reclutamiento de la serina-treonina cinasa Raf y a la activación de la MAPK ERK que promueve proliferación y diferenciación de los megacariocitos (González-Villalva,2010).

### 1.3 Plaquetas

Las plaquetas que son elementos sanguíneos anucleados derivados de la fragmentación citoplasmática de los megacariocitos tienen forma de disco biconvexo, su concentración normal en sangre periférica en el hombre es de 150 a 400 x 10<sup>9</sup>/L y su vida es de entre 7 y 10 días y junto con los eritrocitos y leucocitos constituyen los elementos formes de la sangre.

Tienen glucógeno, mitocondrias y dos tipos de gránulos: gránulos alfa y densos. Los gránulos alfa son estructuras grandes, ricas en macromoléculas además de glicoproteínas y moléculas de adhesión. Tienen una importante participación en el funcionamiento celular, al propiciar la interacción entre plaquetas además de la interacción con otras células a través de la liberación de su contenido.

Los gránulos densos se caracterizan por su alta densidad electrónica que le confieren el elevado contenido en calcio y fósforo inorgánico, además tienen ADP, ATP y serotonina.

La participación de las plaquetas en los diferentes procesos de la hemostasia depende de tres eventos fundamentales: la adhesión plaquetaria, el cambio de forma y la agregación plaquetaria.

En la adhesión plaquetaria éstas se adhieren a las superficies utilizando como ligando al fibrinógeno, a través de su unión a GPIIb/IIIa, también se adhieren al colágeno, vWF y fibronectina. El cambio de forma es la primera manifestación física de la activación plaquetaria, la cual se da por el estímulo de la trombina, el colágeno, el ADP, la epinefrina y el tromboxano A<sub>2</sub>, lo que permite una firme adhesión de las plaquetas y la secreción de las sustancias procoagulantes y proinflamatorias contenidas en ellas, lo que hace que el trombo crezca y se consolide su formación.

Las plaquetas adheridas permanecen vivas durante horas o días en el sitio de la lesión vascular y liberando factores de inflamación y factores de la coagulación, manteniendo es coagulo estable hasta que se repare el vaso sanguíneo (Fernández *et al*, 2012; García & Coma, 2000; López & Macaya, 2013).

Dada la importancia de las plaquetas y los megacariocitos, es importante estudiar los efectos de compuestos que pretenden ser utilizados como fármacos o que tienen potencial farmacológico, tal es el caso del vanadio, que si bien se ha estudiado por sus efectos tóxicos también se le han observado efectos benéficos en algunas enfermedades.

## **2. Efecto del vanadio los megacariocitos.**

En estudios previos de nuestro laboratorio, se ha observado que los megacariocitos de ratones expuestos a la inhalación de pentóxido de vanadio, aumentan su tamaño, número y las lobulaciones de los núcleos (Piñón Zárate 2005). Con este mismo modelo de inhalación, Fortoul y colaboradores (2008) reportaron un aumento en el número y tamaño de los megacariocitos en el bazo de ratones CD-1 a lo largo del tiempo de exposición desde la primer semana, desatacando la semana 4 donde se presenta la mayor diferencia y la semana 8 donde los cambios se estabilizan; posteriormente en 2009 Fortoul y colaboradores en un análisis ultraestructural observaron una modificación en la cromatina y un aumento en el tamaño del núcleo y de los poros nucleares en los megacariocitos de bazo y médula ósea; así como de los gránulos en el citoplasma. Además, Díaz Fuentes en el 2009 relacionó la megacariocitosis con el incremento en la producción de TPO principalmente en el hígado que se da cuando los individuos son expuestos a vanadio.



### 3. Efecto del vanadio en sangre

Los efectos del vanadio en los valores hematológicos son contradictorios, debido a que algunos autores como Zaporowska (1989;1992), presentan cambios en algunos índices sanguíneos como eritrocitos, hemoglobina y aumento en leucocitos, mientras que en otros estudios como el de Dai & McNeil (1994) no muestran cambios. En la Tabla 1 se muestran con detalle los diferentes estudios y autores, así como los efectos con diferentes compuestos de vanadio, dosis y vía de exposición.

Tabla 1. Antecedentes de los efectos del vanadio sobre los parámetros sanguíneos.

Autor	Compuesto / Dosis	Vía de Exposición/ Modelo.	Efecto
Dai & McNeil, 1994	Vanadil Sulfato 0.5mg/L	Oral Rata Wistar	Sin modificaciones hematológicas.
Zaporowska & Wasilewski, 1989;1992	Metavanadato de Amonio 23-29mg/kg	Oral Rata Wistar	Disminución de eritrocitos, hemoglobina. Aumento en leucocitos.
Fawcett <i>et al</i> , 1997	Vanadil Sulfato 0.5 mg/kg/día	Oral Humanos	Sin modificaciones hematológicas.
Cohen <i>et al</i> , 1995	Vanadil Sulfato 100 mg/día	Oral Humanos	Disminución de hemoglobina y leucocitos.
Obianime <i>et al</i> , 2009	Metavanadato de Amonio 0-10 mg/Kg	Oral Rata Wistar	Disminución de hemoglobina, linfocitos y leucocitos.
González Villalva <i>et al</i> , 2004	Pentóxido de Vanadio 0.02M	Inhalada Ratones CD1	Aumento en leucocitos y plaquetas

## **4. Vanadio**

El vanadio es un metal de transición de número atómico 23, ocupa el lugar número 22 entre los elementos más abundantes en la Tierra, es un metal de color grisáceo con densidad de  $6.11 \text{ g/cm}^3$ , con diferentes estados de oxidación, que van del -1 al +5 pasando de un estado a otro por la transferencia de un electrón a través de procesos de óxido-reducción, sin embargo, sólo los estados V-III, V-IV y V-V tienen función biológica participando en procesos biológicos en forma de anión o catión. Existen diferentes compuestos de vanadio usados en la toxicología y en la industria, como óxidos de vanadio y sales de vanadio como son el metavanadato de amonio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ), metavanadato de sodio ( $\text{NaVO}_3$ ), ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), sulfato de vanadilo ( $\text{VOSO}_4$ ), oxidocloruro de vanadio ( $\text{VOCl}_2$ ) y tricloruro de vanadio ( $\text{VCl}_3$ ), los cuales se disuelven en agua. (Rodríguez-Mercado & Altamirano-Lozano, 2006; Thompson, 2006).

### **4.1 Vías de Exposición.**

#### **4.1.1 Vía inhalada.**

La vía inhalada es la principal vía de exposición y donde más se absorbe el vanadio (25%) debido a que se adosa a partículas suspendidas presentes en la contaminación ambiental, las cuales atraviesan fácilmente la barrera hemato-respiratoria (Rodríguez- Mercado & Altamirano-Lozano, 2006).

#### **4.1.2 Vía dérmica.**

Por la vía cutánea hay una absorción mínima debido a que los compuestos de vanadio son poco liposolubles (Barceló, 1999; Rodríguez- Mercado & Altamirano-Lozano, 2006).

#### **4.1.3 Vía oral.**

Por la vía oral se absorbe menos del 10% del vanadio que ingresa. Diariamente consumimos alrededor de 1 µg proveniente del aire, 11 a 30 µg provenientes del agua bebida y de algunos alimentos que son ricos en este elemento: los hongos, mariscos, semillas de eneldo, perejil y pimienta negra.

La mayoría del vanadio ingerido es transformado a su forma catiónica en el estómago antes de ser absorbido en el duodeno. El vanadio ingerido se elimina mayormente en bilis y finalmente en heces. Sin embargo, la principal vía de eliminación del vanadio es a través de la orina durante las primeras 20 horas (fase rápida) y días después a los 40-50 días (fase lenta), el resto. (Rodríguez & Altamirano, 2006); (García-Graciela, 2006).

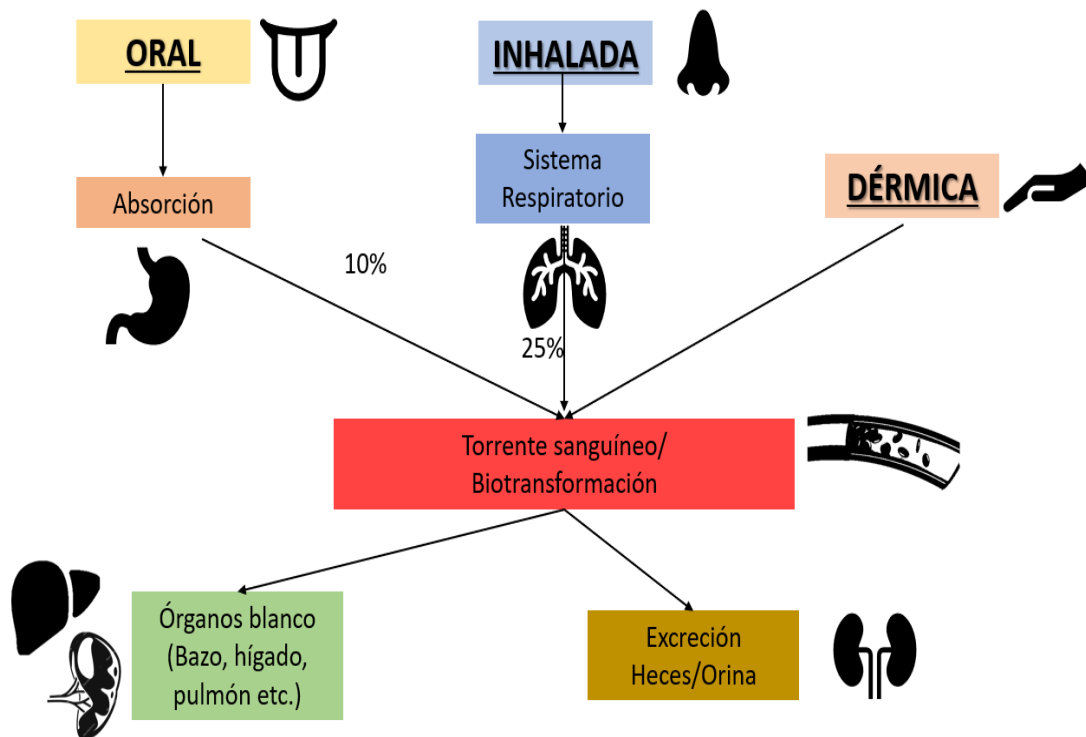


Figura 5. Toxicocinética del vanadio. (Modificado de Rodríguez & Altamirano, 2006).

#### 4.2 Toxicocinética y Toxicodinámica del vanadio.

El vanadio es muy peculiar debido a que sus efectos son diferentes y dependientes del compuesto, dosis y vía de exposición (Domingo *et al.* 1991).

Al ingresar al organismo por las vías más comunes como lo son la vía oral o inhalada el vanadio es transportado en la circulación sanguínea por la albúmina y la transferrina, de esta manera llega a los distintos órganos blanco como el hueso, hígado, riñones y bazo (Thompson & Órbigo, 2006).

El vanadio a pH cercano a 7 se encuentra exclusivamente en forma de catión  $V^{3+}$  y en el ambiente celular se encuentra formando compuestos (Rodríguez-Mercado, 2006). El ion vanadato ( $VO_4^{3-}$ ) se comporta como un análogo estructural y electrónico

del ion fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), por lo que participa en reacciones de protonación similares a las que involucran al fosfato. Gran parte de la importancia biológica de los compuestos de vanadio reside en estas analogías, ya que tiene efectos sobre algunas vías de señalización además de interferir en sistemas enzimáticos que también tienen fosfatos como ATPasas y fosfatasas además es capaz de incrementar los niveles de citocinas como interleucinas y regular la activación de ERK/MAPK (González-Villalva *et al*, 2010; Mukherjee *et al.*, 2004; Crans, 2004).

### **4.3 Uso Farmacológico del vanadio.**

Se han investigado, desde los 80's, los usos farmacológicos del vanadio reconociendo a este metal como un elemento con función biológica con posible rol regulatorio en el organismo, frecuentemente relacionado con rutas metabólicas de glucosa y lípidos y con efectos enzimáticos, tanto estimulantes como regulatorios, debido a que desde los primeros estudios realizados en modelos animales e *in vitro* se le descubrió un acción hipoglucemiante usando sales de vanadio, resurgiendo así su investigación y el interés por conocer las bases de sus funciones en el organismo (Alvino De la Sota *et al*, 2007). También se ha observado que los compuestos de vanadio como el diclorovanadoceno y el Metvan son efectivos contra la proliferación de células de cáncer de mama y glioblastoma (Navarra *et al*, 2001; D'cruz & Uckum, 2002); de igual manera se ha observado el efecto del vanadio en la vasoconstricción, el aumento de la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina y la reducción del colesterol, los triacilglicéridos y los niveles de glucosa (Mukherjee *et al.* 2004). En cuanto a este último punto se ha observado que diversas sales de vanadio tienen efectos positivos en la Diabetes mellitus, al disminuir la glucosa en sangre por su

actividad insulino-mimética. Entre las sales de vanadio que han sido utilizadas destaca el metavanadato de sodio (Domingo *et al.* 1991; Pacheco *et al.* 2006).

#### **4.4 Metavanadato de Sodio (NaVO<sub>3</sub>).**

Es una sal de vanadio con peso molecular de 121.93 estado de oxidación V, soluble en agua (Rodríguez- Mercado & Altamirano-Lozano, 2006), es una de las sales de vanadio más utilizadas en investigación debido a que se ha observado que tiene efecto hipoglucemiante (Pacheco *et al.*, 2006) y se ha probado en humanos con dosis de 10mg, reportándose como único efecto secundario intolerancia gastrointestinal (Goldfine, 1995); también se ha probado como agente antiproliferativo en células cancerígenas de páncreas, donde se observó que el vanadio indujo la activación de las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK de forma dependiente de la dosis y el tiempo (Wu *et al.*, 2016), así un estudio en el que con las dosis de 5 y 10 mg de MVS se estudió su función parasitostática sin presentar citotoxicidad y genotoxicidad (Casarrubias-Tabarez, 2019).

## **5. Justificación.**

El empleo de metavanadato de sodio en estudios experimentales ha aumentado en los últimos 30 años debido a su uso potencial en el tratamiento de algunas enfermedades; sin embargo, para utilizar cualquier compuesto se requiere conocer su efecto en diferentes órganos, como el bazo ya que se ha observado que en este órgano el vanadio, por vía inhalada, modifica la morfología de los megacariocitos lo que podría alterar su función en la producción de plaquetas, por lo que es importante evaluar el efecto de éste por vía oral en estas células y conocer si su administración, por esta vía, tiene el mismo efecto.

## **6. Hipótesis.**

Si el vanadio por la vía inhalada ha mostrado que tiene efecto en el tamaño y en la cantidad de los megacariocitos, entonces por vía oral se observará un efecto semejante.

## **7. Objetivo general.**

Identificar las diferencias morfológicas y en cantidad de megacariocitos en el bazo de ratón después de la administración oral de metavanadato de sodio.

## **7.1 Objetivos particulares.**

- Determinar la dosis NOAEL de metavanadato de sodio por vía oral en el ratón.
- Identificar las diferencias en el número y tamaño de los megacariocitos en el bazo de ratón por dosis y tiempo de exposición.

## **8. Método.**

### **8.1 Determinación de la dosis.**

Se realizó previo al estudio experimental una curva dosis-respuesta con diferentes dosis de metavanadato de sodio (5mg, 10 mg, 15mg y 20 mg), donde se observó que con las dosis mayores los ratones presentaban sangrado rectal, por lo que se utilizaron las dosis en que no se presentaba esa alteración y además sin reporte de genotoxicidad y citotoxicidad. (Casarrubias-Tabarez, 2019).

### **8.2 Administración.**

Se utilizaron 100 ratones machos de la cepa CD1 de 30 - 35 gramos, con agua y alimento *ad libitum* y periodos de luz oscuridad 12/12, a los que se les dividió en tres grupos: control y expuestos (5mg y 10mg), se les administró por medio de sonda orogástrica el metavanadato de sodio disuelto en agua con su respectiva dosis (5 mg y 10 mg) a los expuestos y agua en el caso del control, por 4 días a la semana durante 4 y 8 semanas. El manejo y cuidado de los animales de laboratorio se realizó con base en los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y con



los lineamientos institucionales. Este protocolo fue aprobado por las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina con el número de dictamen 090/2016.

### **8.3 Obtención de muestras.**

Al término de la semana 4 y semana 8 se sacrificaron 20 ratones de cada grupo, mediante dosis letal de pentobarbital sódico, por medio de punción intracardiaca se extrajo sangre (500  $\mu$ L) con ayuda una jeringa se colocó en un *vacutainer* con EDTA como anticoagulante para los hemogramas. Posteriormente se les disectó para extraer el bazo completo el cual fue pesado; después se colocó el bazo en formaldehído al 10%, posteriormente se realizó la técnica histológica convencional, los cortes se realizaron de la parte media del bazo y con un ancho de 5 $\mu$ m.

### **8.4 Hemogramas.**

Para conocer el conteo plaquetario se realizaron hemogramas con del *Auto Hematology analyzer*, de Coulter (Bc 2800 Vet. Mindray) en el cual de manera electrónica se realiza el conteo de células sanguíneas (eritrocitos, plaquetas y leucocitos etc.). Este estudio se realizó en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

### **8.5 Conteo y Medición de Megacariocitos**

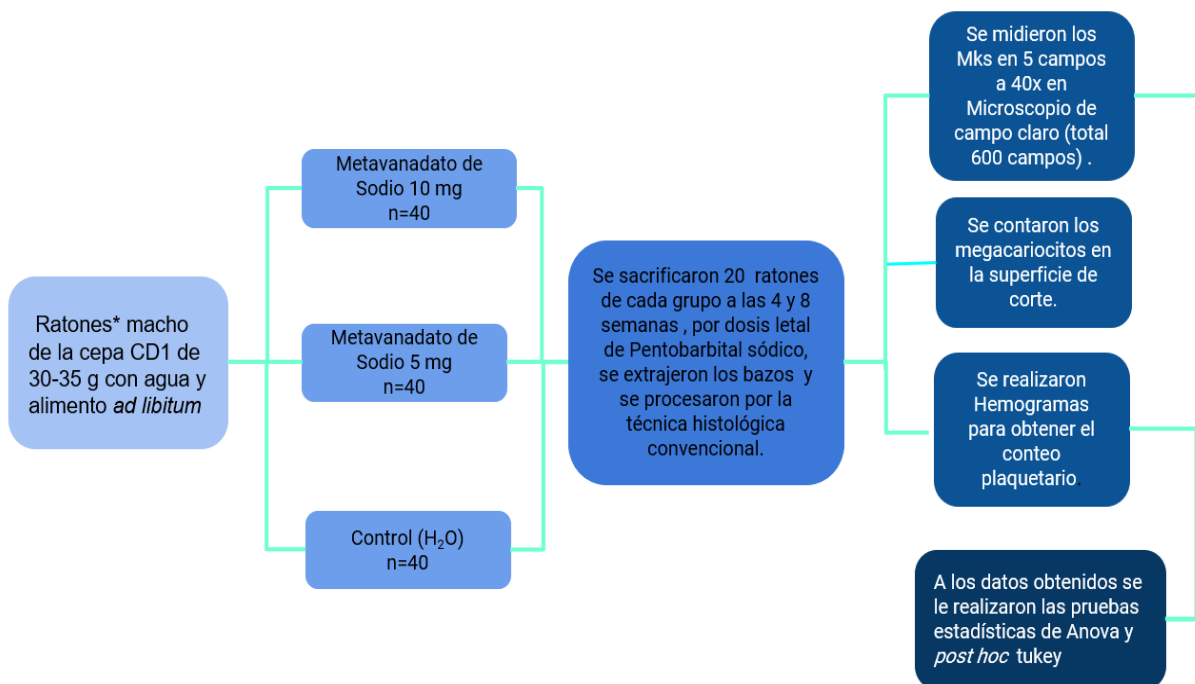
Los cortes se observaron en un microscopio óptico Zeiss a 40X donde a los megacariocitos se les midió el diámetro mayor con una regleta integrada al ocular y

también se realizó el conteo de los MK en toda la superficie de corte del bazo, tomando fotomicrografías del bazo a 20x y contabilizando con ayuda del programa Image J 1.52a (Schneider *et al*,2012).

## 8.6 Análisis Estadístico.

Con la base de datos obtenida de las mediciones y conteos que se realizaron se hizo el análisis estadístico descriptivo para obtener las medidas de dispersión para después hacer un análisis estadístico diferencial con ANOVA y *post hoc* de Tukey para encontrar las diferencias entre los tratamientos y tiempos con el programa GraphPad Prisma versión 6. Se consideró que existía diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$ .

Figura 6. Diagrama simplificado del método empleado.



## 9. Resultados.

### 9.1 Megacariocitos totales.

En el conteo de megacariocitos se notó que la cantidad de megacariocitos aumentó con respecto del control de manera significativa en ambos tiempos (semana 4 y semana 8) en la dosis de metavanadato de sodio 10 mg (MV10).

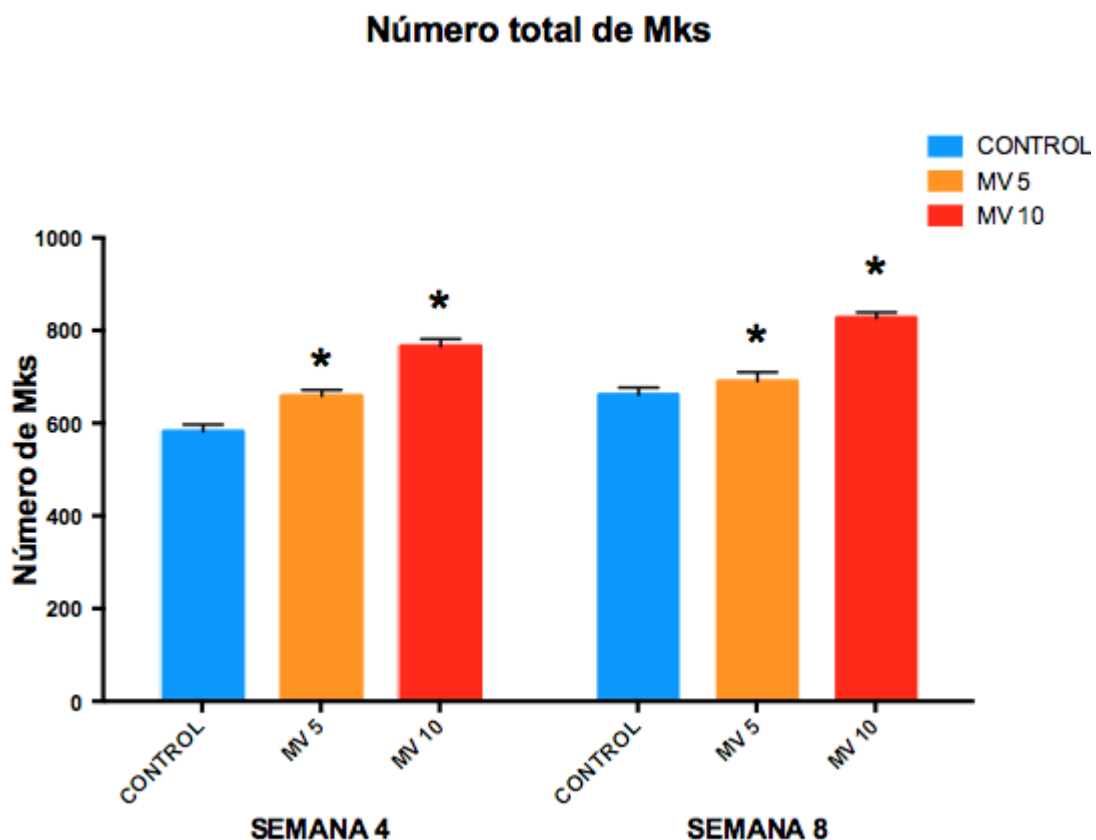


Figura 7. Resultados del conteo de los megacariocitos en todo el bazo, comparación entre los diferentes grupos y tiempos. Se observaron diferencias significativas en los grupos MV5 (metavanadato de sodio 5 mg) y MV 10 (metavanadato de sodio 10mg) contra el control.

\*Diferencia contra el control.

ANOVA *post-hoc* Tukey  $p < 0.05$ .

## Análisis histológico

También se observó un aumento en los Megacariocitos totales en los tratamientos de MV5 y MV 10 en la semana 4 y 8 como se puede ver en las imágenes de la figura 8 y 9 respectivamente.

### SEMANA 4

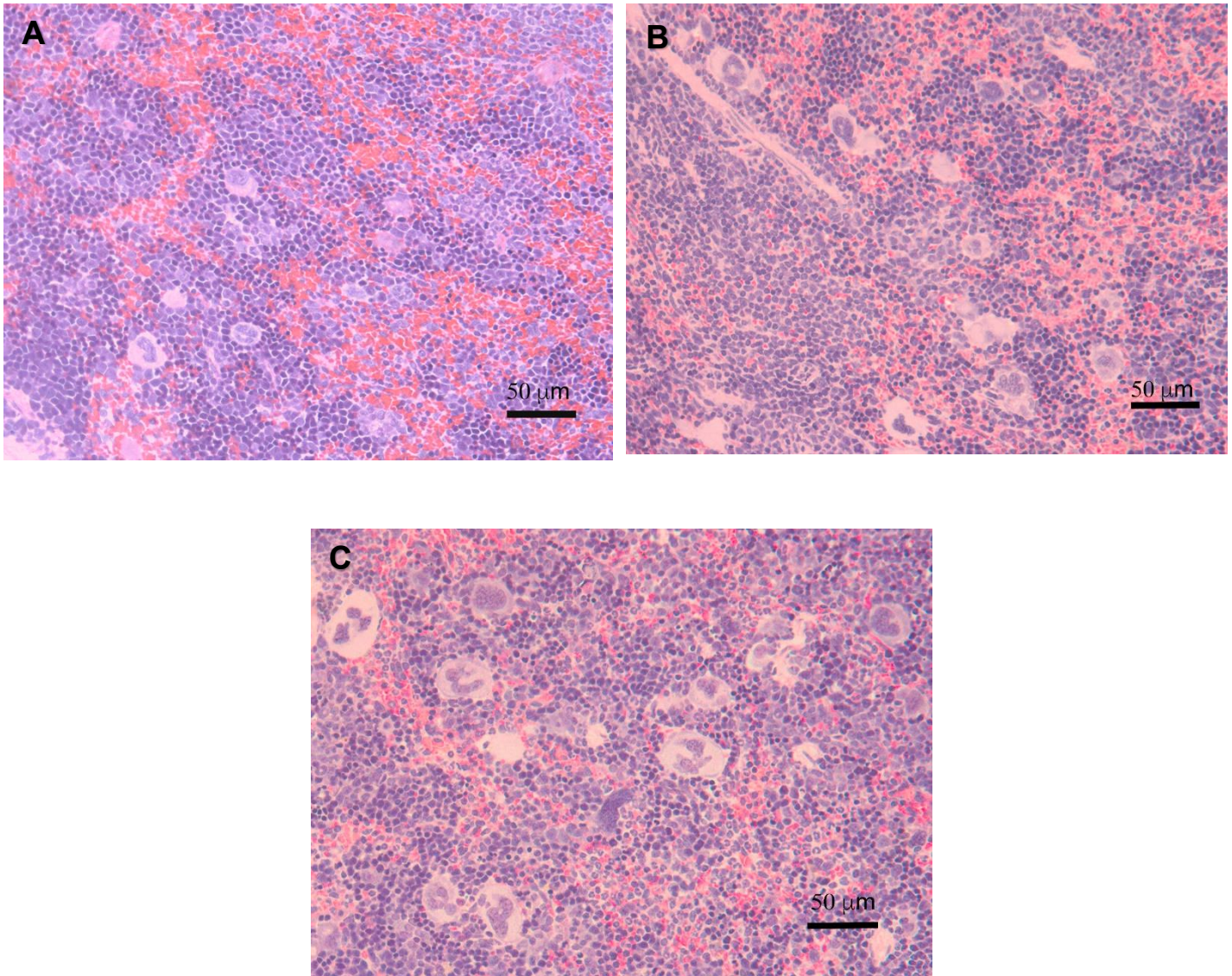


Figura 8. Imágenes en los que se observan los cambios en el número de megacariocitos en los grupos tratados MV5 (B) y MV10 (C) de la semana 4 con respecto control (A).

H.E.40x.



## SEMANA 8

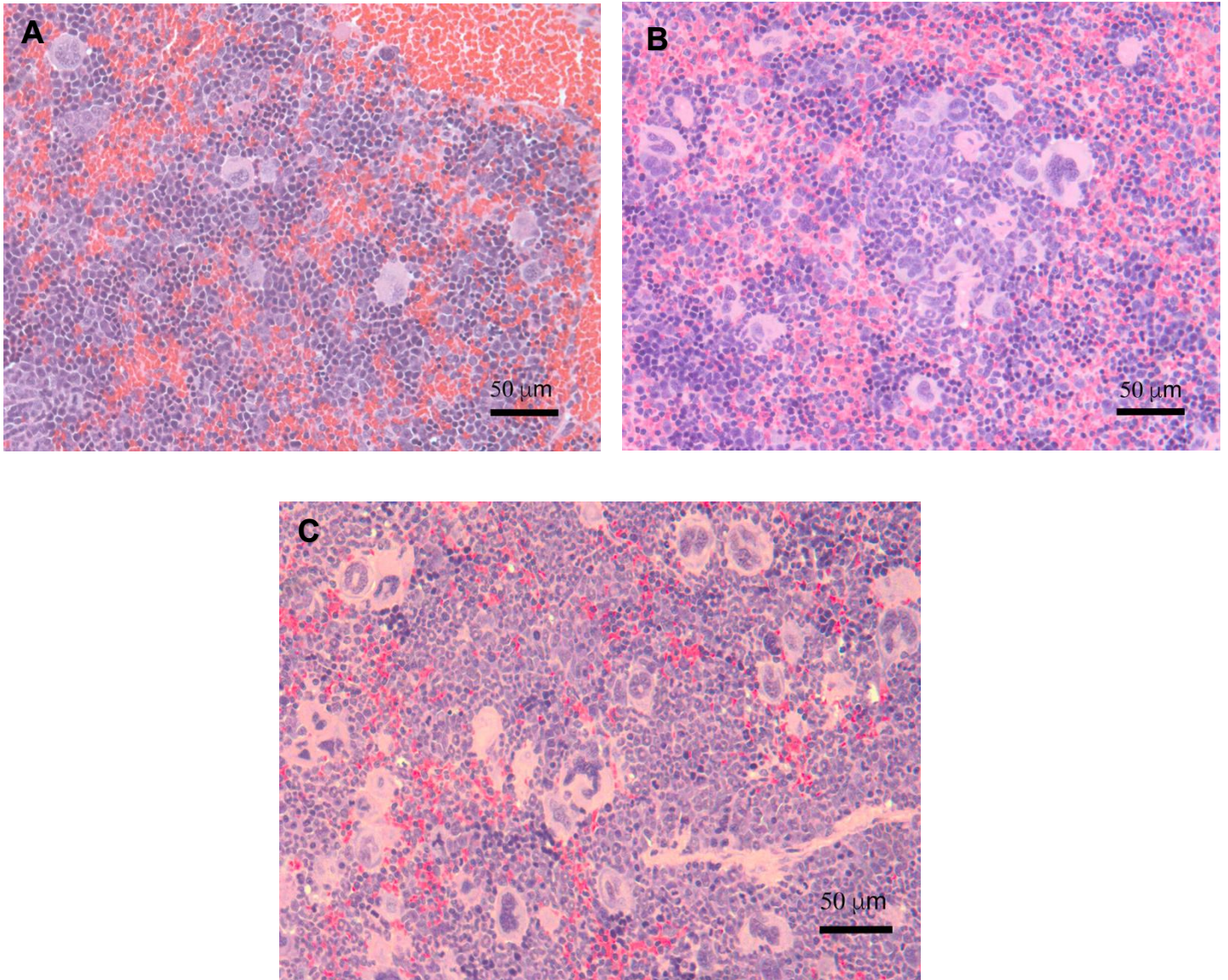


Figura 9. Imágenes en las que se observa un aumento en el número de los megacariocitos en los grupos tratados MV5 (B) y MV10 (C) de la semana 8 con respecto al control (A).

Microscopio Óptico 40x.

## 9.2 Tamaño de Megacariocitos.

Se observaron diferencias en el tamaño de los megacariocitos en la dosis de MV 10 mg y MV 5 mg con respecto del control; sin embargo, no hay diferencias entre los tratamientos de metavanadato.

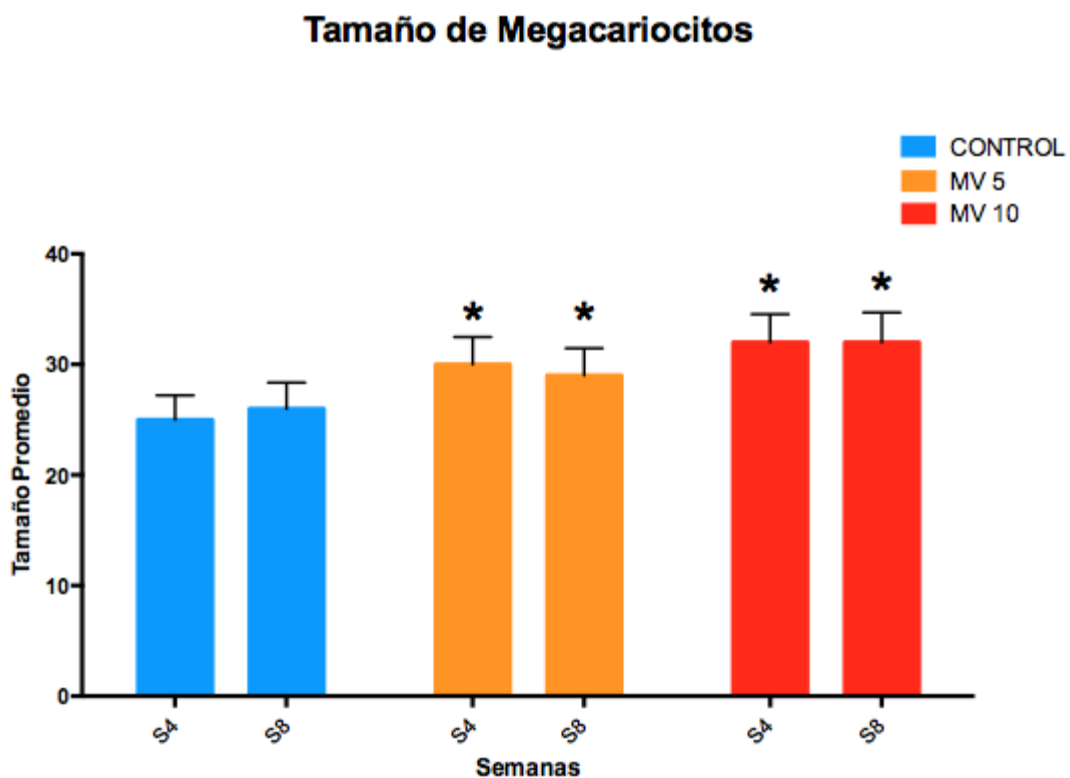


Figura 10. Diferencias en el diámetro de los megacariocitos con diferentes dosis de metavanadato de sodio 5mg y 10 mg (MV5 y MV10) con respecto del tiempo de exposición.

\*Diferencia contra el control.

ANOVA post-hoc Tukey  $p < 0.05$ .



## Análisis histológico

También se observó un aumento en el tamaño de los Megacariocitos en los tratamientos de MV5 y MV 10 en la semana 4 y 8 como se puede ver en las imágenes de la figura 8 y 9 respectivamente.

### SEMANA 4

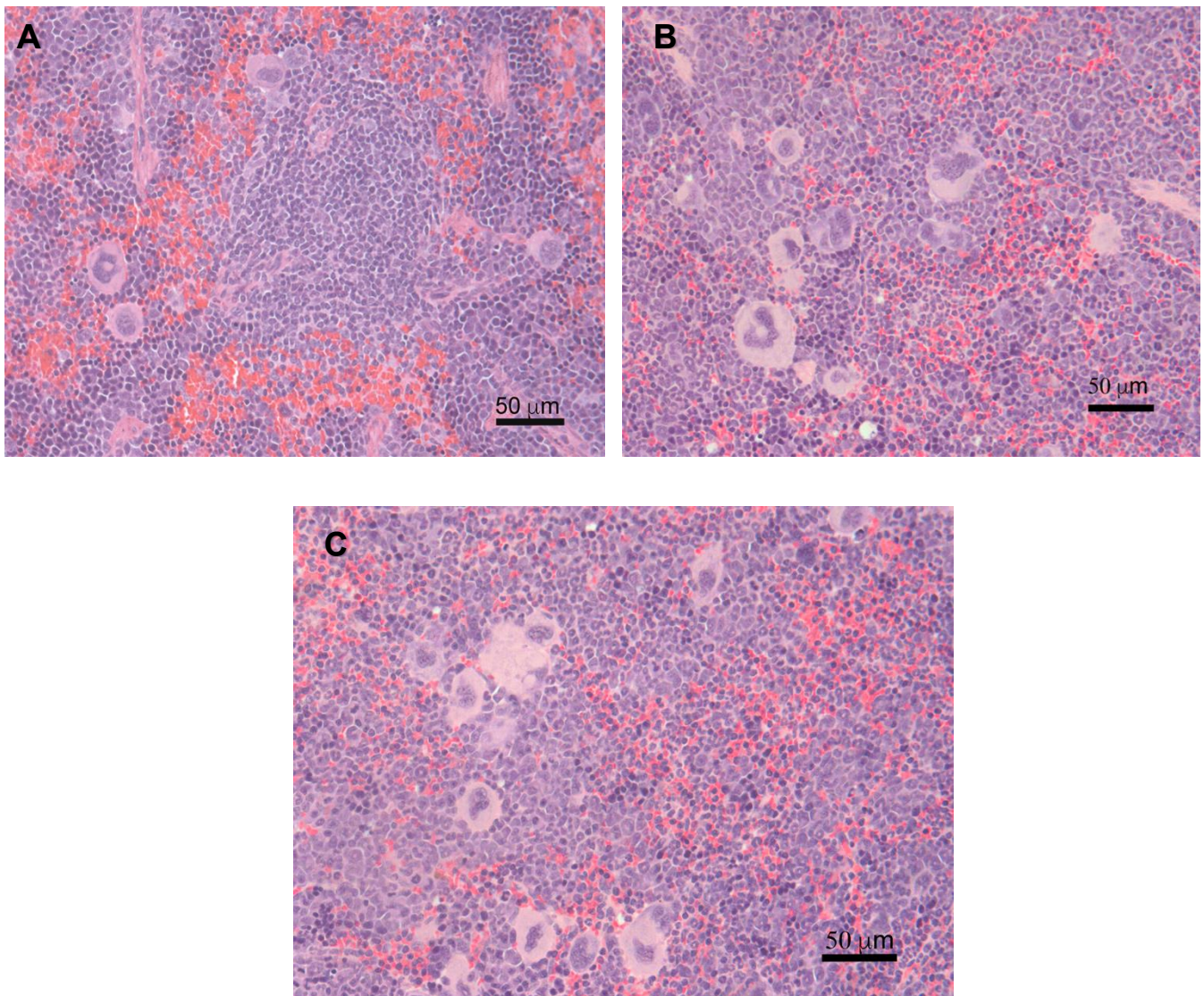


Figura 11. Tamaño de los megacariocitos en los grupos tratados MV5 (B) y MV10 (C) de la semana 4 con respecto del control (A).

H.E. 40x.

## SEMANA 8

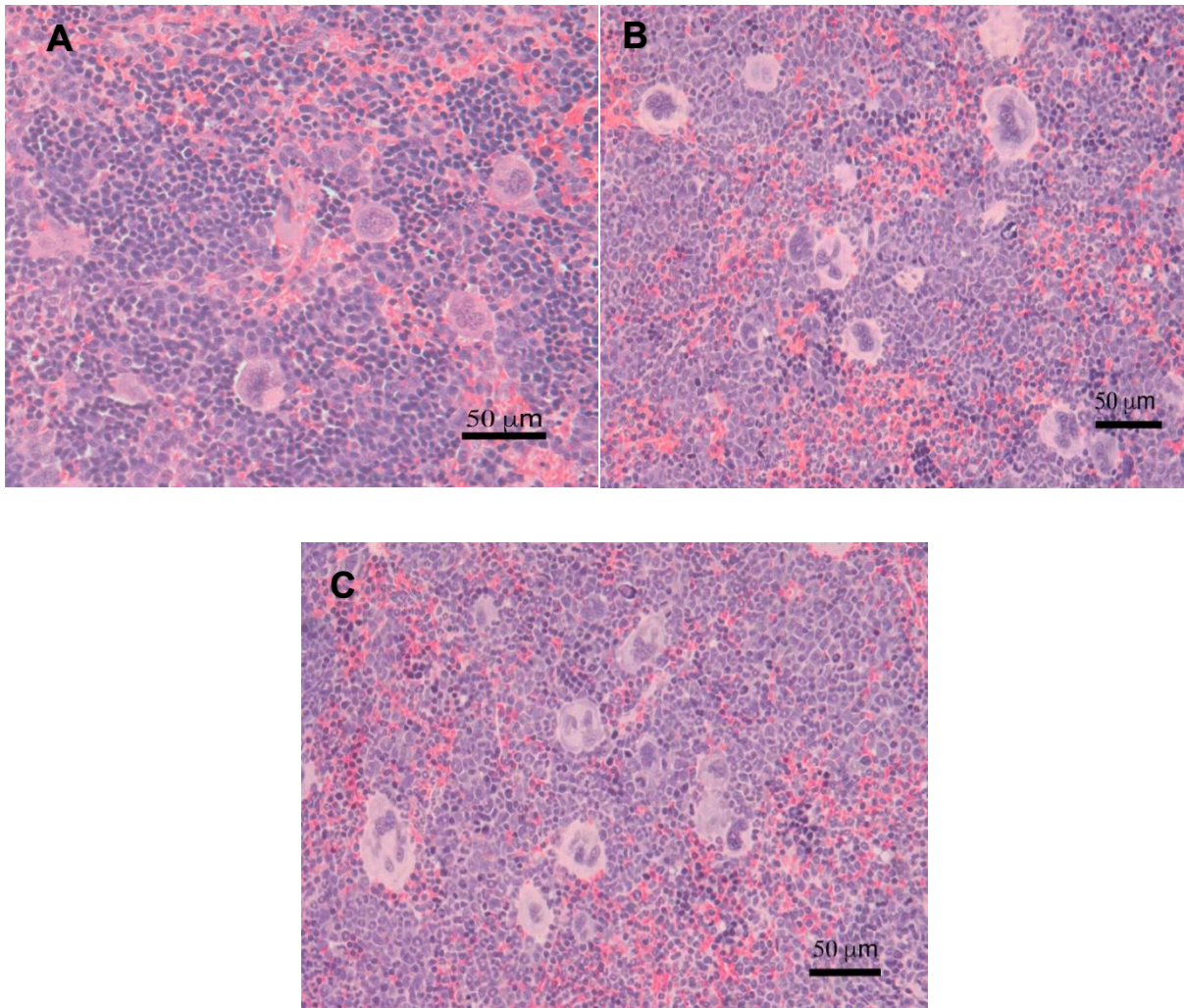


Figura 12. Modificación en el tamaño de los megacariocitos en los grupos tratados MV5 (B) y MV10 (C) de la semana 8 con respecto al control (A).

H.E. 40x.



## Hallazgos Complementarios

### 9.3 Lobulación

La lobulación es un indicador de la maduración o ploidía de los megacariocitos, en este modelo por vía oral se observó un aumento en la lobulación.

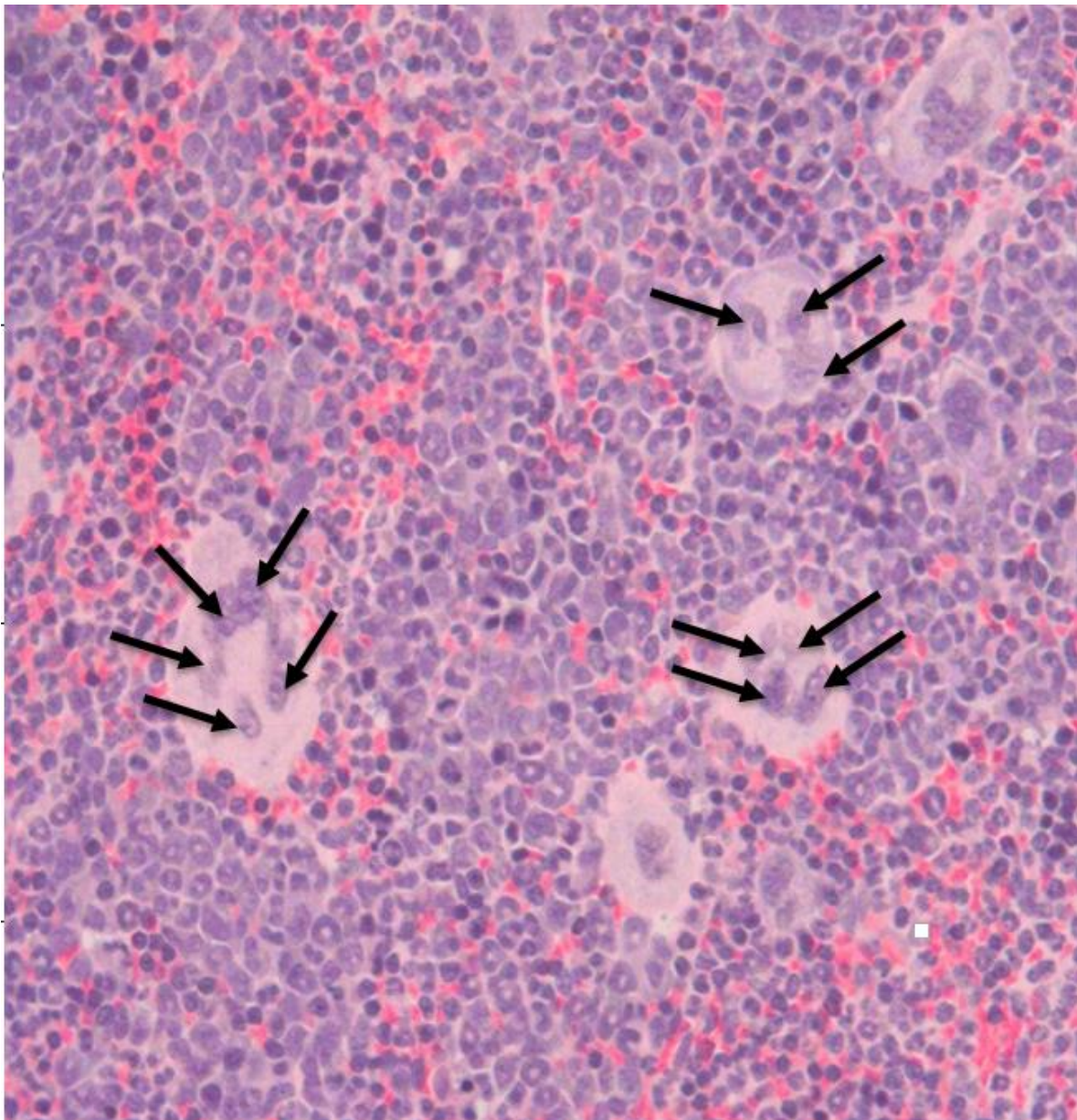


Figura 13. Aumento en la lobulación de los megacariocitos, cada lóbulo está señalado por una flecha. H.E. 40x. Grupo MVS 10mg Semana 8.

## 9.4 Hemogramas.

En los hemogramas realizados se observó un aumento en el conteo plaquetario en la semana 4 y en la semana 8 en ambas dosis, de acuerdo con el valor de referencia obtenido de los datos del control. Además, se observó en ambas semanas y en ambas dosis que los valores de hemoglobina, hematocrito y eritrocitos no difieren del control y a pesar de que se observa un aumento de leucocitos comparado al control esto no es significativo estadísticamente.

	Semana 4			
	Control	MV 5mg	MV 10mg	Unidades
<b>Plaquetas</b>	320 ± 26.76	505.66 ± 17.21	509.33 ± 33.08	x10 <sup>9</sup> /L
<b>Hemoglobina</b>	114 ± 1	112.66 ± 2.51	115 ± 1	g/L
<b>Leucocitos</b>	14.16 ± 1.45	14.5 ± 0.62	15.56 ± 0.87	x10 <sup>9</sup> /L
<b>Hematocrito</b>	0.46 ± 0.05	0.50 ± 0.045	0.493 ± 0.030	g/L
<b>Eritrocitos</b>	9.4 ± 1.50	10.73 ± 0.68	9.73 ± 0.85	X10 <sup>12</sup> /L
	Semana 8			
	Control	MV 5mg	MV 10mg	Unidades
<b>Plaquetas</b>	335 ± 36.09	507.66 ± 15.30	512 ± 51.39	x10 <sup>9</sup> /L
<b>Hemoglobina</b>	114 ± 2	111.66 ± 1.52	113 ± 1	g/L
<b>Leucocitos</b>	14.46 ± 0.85	14.53 ± 1.22	16.16 ± 0.41	x10 <sup>9</sup> /L
<b>Hematocrito</b>	0.553 ± 0.06	0.59 ± 0.045	0.546 ± 0.064	g/L
<b>Eritrocitos</b>	10.36 ± 1.20	10.63 ± 0.61	10.76 ± 1.05	X10 <sup>12</sup> /L

Tabla 2. Promedio de los valores obtenidos de los hemogramas en cada grupo y tiempo.

### 9.5 Peso del Bazo.

A los datos obtenidos del peso húmedo del bazo, se les realizaron las pruebas estadísticas de ANOVA con *post hoc* de Tukey; no se encontró diferencia en el peso de los bazos contra el control, entre ningún tratamiento y tampoco entre los diferentes tiempos.

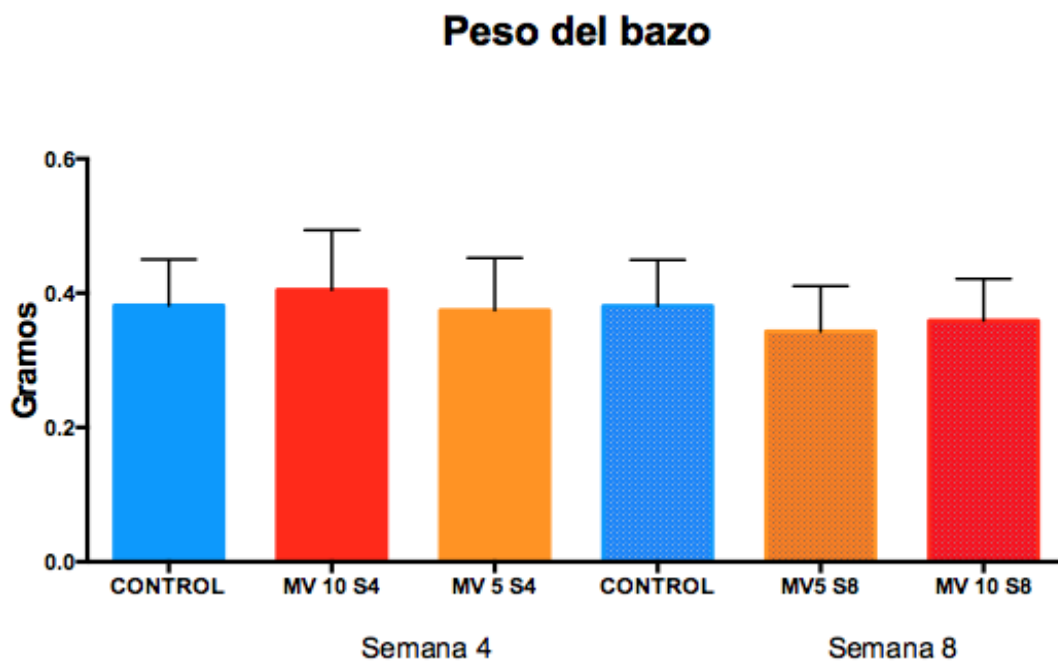


Figura 14. Promedio del peso del bazo por grupo y tiempo ( $\bar{x} \pm ER$ ). No se observan diferencias en los tratamientos MV5 (metavanadato de sodio 5mg) y MV10 (metavanadato de sodio 10mg) en ningún tiempo ni contra el control. ANOVA *post-hoc* Tukey  $p < 0.05$



## 9.6 Tejido linfoide del bazo

Se observó de manera cualitativa un aumento en la pulpa blanca del bazo con relación a la dosis y el tiempo.

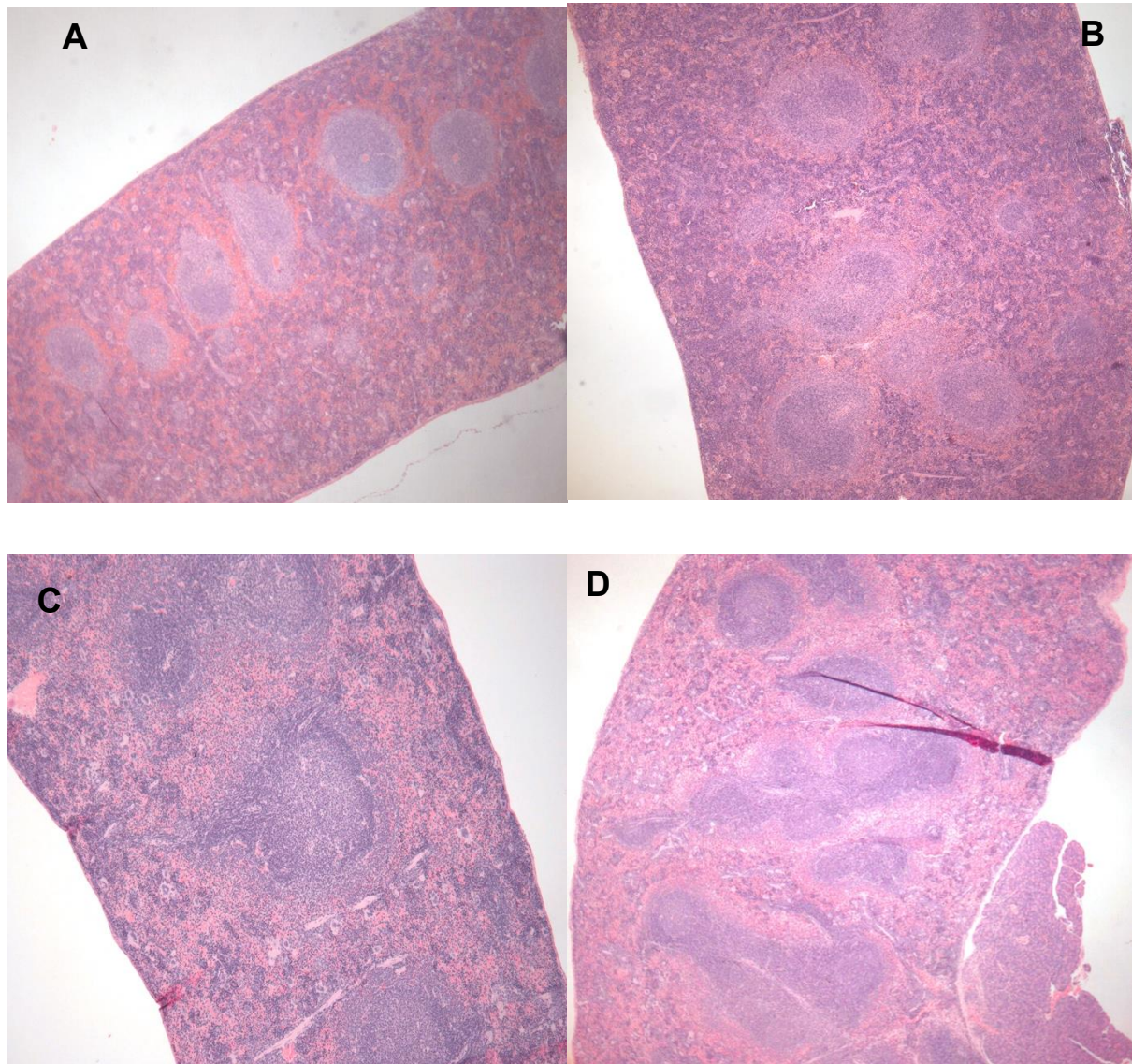


Figura 15. Modificación de la pulpa blanca del bazo por administración de metavanadato de sodio. Como se puede ver en los grupos expuestos B (Metavanadato 5mg Semana 4), C (Metavanadato de sodio 10 mg Semana 4) y D (Metavanadato 10mg Semana 8) se observa un aumento en la pulpa blanca comparados con los controles A (Control)

## 10. Resumen de Resultados

El Metavanadato de sodio administrado por vía oral:

- Incrementa el número y tamaño de los megacariocitos en el bazo
- Aumenta el número de plaquetas en sangre por el incremento de megacariocitos o por un desorden mieloproliferativo.
- No modifica los valores de hemoglobina, hematocrito y eritrocitos.
- No produce esplenomegalia.
- Incrementa la pulpa blanca en el bazo que puede deberse a la estimulación inespecífica del vanadio al sistema inmune.

## **11. Discusión**

La administración de metavanadato por vía oral indujo cambios en la morfología de los megacariocitos lo que se manifestó como aumento en su número y tamaño. De igual manera también se observó aumento en el número de plaquetas en sangre de acuerdo con la dosis administrada y el tiempo de exposición.

### **11.1 Efecto en Megacariocitos**

Se observó aumento de tamaño y cantidad de megacariocitos y de lobulación en sus núcleos con el tratamiento de metavanadato de sodio en ambas dosis (5 y 10 mg), lo que supone que el vanadio, por vía oral, tiene efecto en la megacariopoyesis y trombopoyesis. Hay dos formas en las que puede el vanadio estar influyendo en la megacariocitosis y trombocitosis. Primero, al actuar directamente sobre la vía de señalización al activar vías de proliferación o de diferenciación de las células progenitoras de megacariocitos y de las células hematopoyéticas (González-Villalva *et al*, 2012). También se puede explicar de manera indirecta debido a que el vanadio produce inflamación (Falcón-Rodríguez,2008) por lo que ésta a su vez haría que se produzcan citocinas que activen la producción de TPO aumentando la megacariopoyesis.

Durante el proceso de megacariopoyesis es necesaria la activación de ciertas vías de señalización como JAK/STAT y las Interleucinas 6,3 y 11 las cuales inducen diferentes procesos esenciales como inducción de proliferación y maduración en los megacariocitos, así como a la endomitosis (Kaushansky *et al*, 2016). Se ha observado que el vanadio es un activador de la vía JAK/STAT que induce la proliferación de los

megacariocitos, aunado a que se sabe que la TPO activa también a la vía JAK/STAT de proliferación y maduración de megacariocitos (González-Villalva *et al*, 2014). Es probable que esta vía también se active cuando el V se administra por vía oral.

La TPO se produce en el hígado, y ésta favorece el crecimiento de los megacariocitos, su receptor Mpl se encuentra en la membrana de estos y la unión TPO/Mpl estimula el desarrollo y proliferación en la línea megacariocítica (González-Villalva,2010); sin embargo se ha observado que en presencia del V los niveles de TPO aumentan (Díaz-Fuentes,2009), lo que indicaría que disminuirían las plaquetas; sin embargo tanto por vía inhalada (González-Villalva,2006) como en este modelo las plaquetas también aumentaron. Lo cual sugiere que el V tiene efecto a nivel mieloproliferativo provocando que tanto los megacariocitos aumentaran su tamaño, cantidad y maduración; así como también aumentarían las plaquetas, lo cual se puede relacionar con la trombocitosis clonal donde el receptor Mpl disminuye su afinidad por TPO por lo tanto hay más TPO y aumentan los megacariocitos (Schafer,2004) o bien, tanto los megacariocitos como las plaquetas se ven aumentadas por la sobreexpresión del TPO (Zhou,1997).

## **11.2 Efecto en Sangre**

Existe una mayor cantidad de estudios sobre los efectos del vanadio en diferentes analitos sanguíneos, sin embargo, existe discrepancia sobre los resultados.

En este estudio se observó un incremento en el número de plaquetas en ambos tratamientos de metavanadato, esto había sido reportado previamente en estudios con otro compuesto de vanadio como lo es el pentóxido de vanadio por vía inhalada

(González Villalva, 2004). Este incremento se explica ya que está muy estrechamente relacionado con los otros efectos observados con los megacariocitos (aumento en tamaño y cantidad) y su relación con TPO e IL-6 que incrementan en presencia del V. Otros parámetros como hemoglobina, hematocrito, eritrocitos no se vieron modificados en este modelo, y coinciden con lo reportado por Dai & McNeil en 1994 y Fawcett y colaboradores en 1997 que hicieron pruebas en sangre con otros compuestos de vanadio administrados como en este modelo por vía oral.

Sin embargo, un valor que se vio incrementado en el grupo de metavanadato fue el de los leucocitos en ambos tratamientos y principalmente en la semana 8, lo que coincide con lo reportado por Zaporowska & Wasilewski, 1989; 1992 y González Villalva y cols. (2004). El aumento en los leucocitos sugeriría un proceso inflamatorio con la liberación de citocinas que estimularía a la megacariopoyesis, sin embargo, el aumento no fue significativo.

De acuerdo con González Villalva y cols., (2012) la función plaquetaria no se ve afectada cuando se administra el vanadio por vía inhalada debido a que se observó un cambio en los marcadores de activación plaquetaria en la semana 4 los cuales fueron revertidos en la semana siguiente, por lo que se podría pensar que a pesar del aumento en los valores plaquetarios, éstos no afectan o aumentan la coagulación, habría que evaluar la función plaquetaria cuando se administra por vía oral para asegurar que no hay riesgo trombótico de su administración por vía oral.



## **11.3 Efecto en el Bazo**

### **11.3.1 Peso del Bazo**

No se encontraron diferencias significativas en el peso del bazo, lo cual indica que la administración del metavanadato de sodio no provoca esplenomegalia, lo cual es coincidente con otros estudios que involucran al vanadio y el bazo (Gonzalez-Villalva,2006)

### **11.3.2 Pulpa blanca**

Se observó un incremento cualitativo en la presencia de pulpa blanca en el bazo en los grupos tratados con respecto del control. En el modelo de inhalación de vanadio se ha observado también este aumento (Piñón Zárte,2005).

La pulpa blanca del bazo está constituida principalmente por linfocitos T y B, los cuales son producidos en médula ósea y después de ser seleccionados migran al bazo, Reyes *et al*, 2006). Contreras y colaboradores reportan que la IL-6 producida por los linfocitos T tiene efectos estimuladores en el crecimiento, proliferación y síntesis de inmunoglobulinas en los linfocitos B (Contreras *et al*,2015). Este efecto lo reportó Piñón en 2005 en el modelo de inhalación de vanadio, en donde reporta un aumento en la pulpa blanca, por lo que también la IL-6 podría estar influenciando en los niveles de TPO.

## 12. Conclusión.

Con el propósito de conocer cuál era el efecto del metavanadato de sodio en el bazo en un modelo murino se realizó este estudio y se encontró que aumentaron los MK tanto en tamaño, número y maduración.

Las dosis utilizadas además de no presentar efecto adverso observable, han sido utilizadas en otros estudios en enfermedades como diabetes y malaria.

En cuanto a los efectos del MVS en el bazo no causa esplenomegalia, además no hay cambios significativos en los parámetros sanguíneos (hemoglobina, hematocrito, eritrocitos y leucocitos)

La megacariocitosis, el aumento de pulpa blanca y de plaquetas si coinciden con el efecto observado en el modelo de inhalación por lo que, si hay un efecto semejante, porque en este modelo no hay cambios en los parámetros sanguíneos y a pesar del incremento plaquetario no hay un aumento tan elevado como en el modelo por vía inhalada.

A pesar del aumento de plaquetas que se observó en el modelo de inhalación, estas no son reactivas, es decir, no representan un peligro trombótico; faltaría explorar los efectos del MVS por vía oral en la función plaquetaria.

Sin embargo, a pesar de los cambios observados en los MK en este estudio no estudiamos el funcionamiento de las plaquetas como resultado de la función del MK.

Faltaría hacer estudios en otros órganos, para continuar con la evaluación del MVS como un compuesto con potencial farmacológico.

### **13. Perspectivas**

En este modelo por VO:

- Evaluar la función plaquetaria.
- Observar la morfología plaquetaria.
- Cuantificar TPO.

### **14. Productos de este proyecto**

#### 1. Artículo de revisión

El megacariocito: Una célula muy original. Adriana González –Villalva, Patricia Bizarro-Nevarés, Marcela Rojas-Lemus, Nelly López-Valdez, Martha Ustarroz-Cano, **Fernanda Barbosa-Barrón**, Brenda García-Gil, Juan Carlos Albarrán-Alonso, Teresa Fortoul van der Goes. (2018). Revista de la Facultad de Medicina, UNAM.

#### 2. Presentación de cartel

**Barbosa Barrón Fernanda**, Casarrubias Tabarez Brenda, Guerrero Alquicira Raquel y Fortoul Teresa. (2018). “Efecto del metavanadato de sodio en la morfología de los megacariocitos del bazo en un modelo murino”. En el XXXIX Congreso Nacional V Iberoamericano de histología. México, CDMX, 17 al 19 de octubre de 2018.

## 15. Bibliografía.

- **Alvino De la Sota N.**, Pacheco Calderón J. & Galli Rigo-Righi C. (2007). Diseño de agentes antidiabéticos de Vanadio desarrollo y avances recientes. Revista de Química. Enero-diciembre. 21(1-2), 37-48.
- **Casarrubias** Tabarez, Brenda, sustentante. (2019). Evaluación del efecto genotóxico y antimalárico del Metavanadato de sodio en un modelo de malaria letal murina. Tesis de maestría, TESIUNAM.
- **Cohen N.**, Halberstam M., Shlimovich P., Chang CJ., Shmoon H. & Rossetti L. (1995). Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin. Invest. 1995; 95:2501-09.
- **Contreras M.**, Bonilla Lara D., Pérez Guerrero E., Ruiz Padilla A., Saucedo Ulloa M., Saldaña Anguiano J., Casillas Iglesias F. & González López L. (2015). Niveles altos de IL-6 asociados a efectos sistémicos y locales en la artritis reumatoide. Enero-abril 2015/Vol. 10, Núm. 1. p. 38-42.
- **Contreras Villa D.** (2013). Origen y destino de los megacariocitos. Morfolia, Volumen 5, Número 3, 2013. ISSN electrónico 2011-9860.
- **Crans**, D.C., Smee J.J., Galdamauskas E. & Yang L. (2004). The Chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. Chem Rev. 104 (2), 849-902.
- **D’Cruz O.J.**, Uckun F.M. Metvan: a novel oxovanadium (IV) complex with broad spectrum anticancer activity. Expert Opinion on Investigational Drugs, 11 (12) (2002), pp. 1829-1836.
- **Dai S.** & McNeill JH. (1994). One-year treatment of non-diabetic and STZ-diabetic rats with vanadyl sulfate did not alter blood pressure or haematological indices. Pharmacol Toxicol, 1994;74:110-115.

- **Díaz Fuentes**, Paola Glenda sustentante. (2009). La participación del pulmón y el hígado en la producción de Tpo en un modelo por inhalación de vanadio. Tesis de Licenciatura. TESIUNAM. México.
- **Domingo** J.L., Gomez M., Llobet J.M., Corbella J. y Keen C.L. (1991). Oral vanadium administration to streptozotocin-diabetic rats has marked negative side-effects which are independent of the form of vanadium used. *Toxicology* vol. 66 issue 3, pp. 279-287.
- **Falcon Rodriguez** Carlos Ivan. (2008). Alteraciones morfológicas pulmonares inducidas por la inhalación de vanadio. Estudio comparativo en rata y ratón. Tesis de Licenciatura. TESIUNAM. México.
- **Fawcett** J., Farquhar S., Walker R., Thou T.& Shand B. (1997). Oral vanadyl sulphate does not affect blood cells, viscosity or biochemistry in humans. *Pharmacol Toxicol* 1997; 80:202-206.
- **Fernández** Delgado N., Hernández Ramírez P. & Forrellat Barrios M. (2012). Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la medicina regenerativa. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* Vol.28 No.3.
- **Fortoul** T., Piñón Zarate G., Díaz Bech M., González Villalva A., Mussali Galante P. Rodríguez Lara V., Colin Barenque L., Martínez Pedraza M. & Montaña L. (2008). Spleen and bone marrow megakaryocytes as target for inhaled vanadium. *Histology and histopathology* vol. 23. pp. 1321-1326.
- **Fortoul** T., González Villalva A., Piñón Zarate G., Rodríguez Lara V., Montaña L., Saldívar Osorio L. (2009). Ultrastructural megakaryocyte modifications after vanadium inhalation in spleen and bone marrow. *Journal of Electron Microscopy* vol. 58 (6) pp. 375-380.
- **García Graciela** Beatriz. (2006). El vanadio, un elemento ambiguo. *Acta. Toxicol. Argent.* 14(2):32-36.
- **García** Mesa M. & Coma Alfonso C. (2000). Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev. Cubana Angiol. y Cir. Vasc.* ;1(2):132-41.

- **Goldfine** A.B., Simonson D.C, Folli F.R., Patti M.E. & Kahn C.R. (1995). Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus in vivo and in vitro studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*80 (11), 3311-3320.
- **González Villalva** Adriana Elizabeth Sustentante. (2004). Alteraciones morfológicas secundarias a la inhalación aguda, subcrónica y crónica de vanadio en Médula ósea, Timo y Sangre periférica. Modelo en Ratón. TESIUNAM.
- **González Villalva** A., Fortoul T.I., Ávila Costa M.R., Piñón Zarate G., Rodríguez Lara V., Martínez Levy G., Rojas Lemus M., Bizarro Nevares P., Díaz Bech P., Mussali Galante P. & Colín Barenque L. (2006). Thrombocytosis induced in mice after subacute and subchronic V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> inhalation. *Toxicology and industrial Health* 2006; 22:113-116.
- **González Villalva** A., Falcon Rodríguez C. & Fortoul van der Goes T. (2010). Vías de señalización implicadas en la megacariopoyesis. *Gac. Méd. Méx.* Vol. 146 No. 2. pp. 136-143.
- **González Villalva** Adriana Elizabeth, sustentante. (2012). Efecto del vanadio en la megacariopoyesis y sus consecuencias en la función plaquetaria / 2012. Tesis de Doctorado. TESIUNAM.
- **González Villalva** A., Piñón Zarate G., Falcon Rodríguez C., López Valdez N. Bizarro Nevares P., Rojas Lemus M., Rendón Huerta E., Colín Barenque L. & Fortoul T. (2014). Activation of Janus Kinase/signal transducers and activators of transcription pathway involved in megakaryocyte proliferation induced by vanadium resembles some aspects of essential thrombocythemia. *Toxicology and Industrial Health.* Vol. 32(5) 908-918.
- **González Villalva** A., Bizarro Nevares P., Rojas Lemus M., López Valdez N., Ustarroz Cano M., Barbosa Barrón F., García Gil B., Albarrán Alonso J. y

- Fortoul van der Goes T. (2018). El megacariocito: una célula muy original. Revista de la Facultad de Medicina. vol. 62 núm. 1. pp. 6-16.
- **Heller** P.G. (2017). Megacariopoyesis y trombopoyesis. HEMATOLOGÍA Volumen 21 N° Extrarordinario: 7-9 Fisiología de la hemostasia normal, 2017.
  - **Kaushansky**, K. (2016). Thrombopoietin and its receptor in normal and neoplastic hematopoiesis. *Thrombosis journal* (14(Suppl1):40, 23-26.
  - **Kutter**, D. J. (2013). The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists. *International journal of hematology*, 98(1), 10-23.
  - **López Farré** A. & Macaya C. (2013). Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev. Esp. Cardiol. Supl.* 2013;13(B):2-7-Vol.13.
  - **Motta** Ramírez GA., Montes Salcedo KE., Martínez Utrera MJ., López Ramírez MA., Pereyra Talamantes A., Ontiveros Rodríguez A., Castillo lima JA., Medina Espinoza B. & Aragón Flores M. (2016). El bazo: cementerio de leucocitos y de conocimientos radiológicos. *Anales de Radiología México*. ene;15(1):58-69.
  - **Mukherjee** B., Patra B., Mahapatra S., Banerjee P., Tiwari A. y Chatterjee M. (2004). Vanadium an element of atypical biological significance. *Toxicology letters* 150 135-143.
  - **Navarra** C.S., Benyumov A., Vassilev A., Narla R.K., Ghosh P., Uckun F.M. Vanadocenes as potent anti-proliferative agents disrupting mitotic spindle formation in cancer cells. *Anti-cancer Drugs*, 12 (4) (2001), pp. 369-376.
  - **Obianime** A.W., Gogo Abite M. & Roberts I.I. (2009). The effects of Ammonium metavanadate on Biochemical Hormonal, Haematological and Histopathological. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*. 24(2):187-194.
  - **Pacheco** Calderón J., Salas Fernández P. y Galli Rigo-Righi C. (2006). Actividad insulino-mimética del Vanadio. *Revista de Química*. Departamento de Ciencias, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.

- **Piñón Zárate** Gabriela, Sustentante (2005). Alteraciones morfológicas de bazo secundarias a la inhalación aguda, subaguda y crónica de pentóxido de vanadio. Modelo en ratón. Tesis. UNAM.
- **Rabaza** J., Fundora H., Rodríguez A. & Hernández M. (2010). Sonografía de bazo y timo como elemento evaluador de la respuesta inmune en niños con infecciones recurrentes. *Vaccimonitor* V.19 No. 2. mayo-ago.
- **Reyes** L., León F., Rozas F., González P. & Naves R. (2006). BAFF: Una citoquina reguladora de linfocitos B implicada en autoinmunidad y cáncer linfoide. *Rev Med Chile* 2006; 134:1175-1184.
- **Rodríguez** Mercado J. y Altamirano Lozano M. (2006). Vanadio: Contaminación, Metabolismo y Genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* vol. 22 (4) pp 173-189.
- **Schafer** Al. (2004). Trombocitosis. *New England Journal of Medicine*, 350 (12), 1211-1219.
- **Schneider** C.A., Rasband W.S. & Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.
- **Thompson** K. & Orvig C. (2006). Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase 1. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 100 (2006) pp.1925-1935.
- **Linden** M., Ward J. and Cherian S. (2020). Hematopoietic and Lymphoid Tissues. In: *Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas*, 1st ed. Piper M. Treuting, p.321.
- **Wu**, J.-X.; Hong, Y.-H.; Yang, X.-G. (2016). Bis(acetylacetonato)-oxidovanadium (IV) and sodium metavanadate inhibit cell proliferation via ROS-induced sustained MAPK/ERK activation but with elevated AKT activity in human pancreatic cancer AsPC-1 cells. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 919–929.



- **Zaporowska H. & Wasilewski W.** (1989). Some selected peripheral blood and haematopoietic system indices in Wistar rats with chronic vanadium intoxication. *Comp Biochem Physiol C.* 1989;93(1):175-180.
- **Zaporowska H. & Wasilewski W.** (1992). Haematological results of vanadium intoxication in Wistar rats. *Comp Biochem Physiol C.* 1992; 102(2): 223-231.
- **Zhou W, Toombs CF, Zou T, Guo J, Robinson MO.** (1997). Transgenic mice overexpressing human c-mpl ligand exhibit chronic thrombocytosis and display enhanced recovery from 5-fluorouracil or antiplatelet serum treatment. *Blood*,1997;89:1551-1559.

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Histología del Bazo.....	1
Figura 2. Megacariocito .....	2
Figura 3. Megacariopoyesis .....	3
Figura 4. Vías de Señalización de la megacariopoyesis.....	5
Figura 5. Toxicocinética y Toxicodinámica .....	11
Figura 6. Diagrama del Método .....	17
Figura 7. Conteo de Megacariocitos .....	18
Figura 8. Conteo de Megacariocitos Semana 4.....	19
Figura 9. Conteo de Megacariocitos Semana 8 .....	20
Figura 10. Tamaño de Megacariocitos .....	21
Figura 11. Tamaño de Megacariocitos Semana 4 .....	22
Figura 12. Tamaño de Megacariocitos Semana 8 .....	23
Figura 13. Lobulación .....	24
Figura 14. Peso del Bazo .....	26
Figura 15. Pulpa Blanca .....	27

	Pág.
Tabla 1. Efecto del Vanadio en Sangre .....	8
Tabla 2. Resultados del Hemograma .....	25