



**RIDUNAJ**  
Repositorio Institucional  
Digital UNAJ



Universidad Nacional  
**ARTURO JAURETCHE**

## Trabajo Final de Grado

Famularo, Cecilia Lourdes

# Puesta a punto y evaluación comparativa de diferentes coloraciones para el estudio de la morfología sanguínea en pacientes VIH positivos

*Instituto de Ciencias de la Salud*

2025

*Carrera: Bioquímica*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.  
Atribución – No comercial – Compartir igual 4.0  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Famularo, C. L. (2025). *Puesta a punto y evaluación comparativa de diferentes coloraciones para el estudio de la morfología sanguínea en pacientes VIH positivos* [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. <https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/3620>



**Instituto de Ciencias de la Salud**  
**Bioquímica**

**Trabajo final:**

**“Puesta a punto y evaluación comparativa de diferentes coloraciones para el estudio de la morfología sanguínea en pacientes VIH positivos”**

Estudiante: Famularo, Cecilia Lourdes.

Directora: Dra. Maydana, Lorena.

## **RESUMEN**

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), descubierto en la década de 1980, continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial y también en Argentina. Más allá de la inmunodepresión característica de la infección, el VIH se asocia con una amplia gama de alteraciones hematológicas, entre las cuales la anemia representa una de las complicaciones más frecuentes y clínicamente relevantes, pero también se ve afectada la serie blanca y las plaquetas. La presencia de anemia en pacientes VIH positivos no solo impacta en la calidad de vida y en la evolución clínica, sino que también constituye un marcador pronóstico en la progresión de la enfermedad. La caracterización hematológica de estos pacientes requiere técnicas confiables que permitan una adecuada evaluación morfológica de las células sanguíneas. En este sentido, las coloraciones utilizadas en los extendidos de sangre periférica resultan herramientas fundamentales en el laboratorio de análisis clínicos. Entre ellas, la coloración de May Grünwald–Giemsa (MGG) es considerado el estándar para la observación de la morfología eritrocitaria y leucocitaria, mientras que la coloración con Giemsa representa una alternativa más sencilla y económica, que podría resultar útil en determinados contextos.

El presente trabajo se llevó a cabo con el objetivo de estudiar qué tinción, del tipo Romanowsky, Giemsa ó May-Grünwald - Giemsa permitiría una mejor visualización, caracterización y valor diagnóstico de las alteraciones hematológicas en extendidos de sangre periférica de pacientes VIH positivos. Para esto se realizó, en cada extendido de sangre, las coloraciones antes mencionadas, la fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y observación de la morfología eritrocitaria que posteriormente fueron comparados con los resultados obtenidos de forma automatizada en el autoanalizador Mindray BC-20.

## ÍNDICE

<b>Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>Marco teórico.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).....</b>	<b>4</b>
1.1. Descubrimiento y relevancia epidemiológica del VIH.....	4
1.2. Estructura, características y transmisión del virus.....	4
1.3. Ciclo de replicación viral.....	7
1.4. Patogénesis e impacto en el sistema inmunitario.....	8
1.5. Efectos del VIH sobre la hematopoyesis.....	9
<b>2. Proceso de hematopoyesis.....</b>	<b>11</b>
<b>3. Evaluación hematológica en el laboratorio clínico.....</b>	<b>12</b>
3.1. Importancia del estudio hematológico en pacientes VIH positivos.....	12
3.2. Hemograma, parámetros hematológicos de rutina.....	12
3.3. Anemia: definición, clasificación y mecanismos fisiopatológicos.....	13
3.4. Evaluación de la morfología celular en sangre periférica.....	13
3.4.1. Morfología normal de las células sanguíneas.....	14
3.4.2. Alteraciones morfológicas en pacientes VIH positivos.....	15
3.5. Preparación del extendido de sangre periférica y técnicas de coloración.....	16
3.5.1. Preparación del extendido de sangre periférica.....	16
3.5.2. Técnicas de tinción.....	17
<b>Trabajo de campo.....</b>	<b>19</b>
<b>1. Objetivo.....</b>	<b>19</b>
<b>2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Resultados.....</b>	<b>19</b>
<b>4. Discusión.....</b>	<b>22</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>24</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>25</b>
<b>7. Anexo.....</b>	<b>27</b>

## MARCO TEÓRICO

### 1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

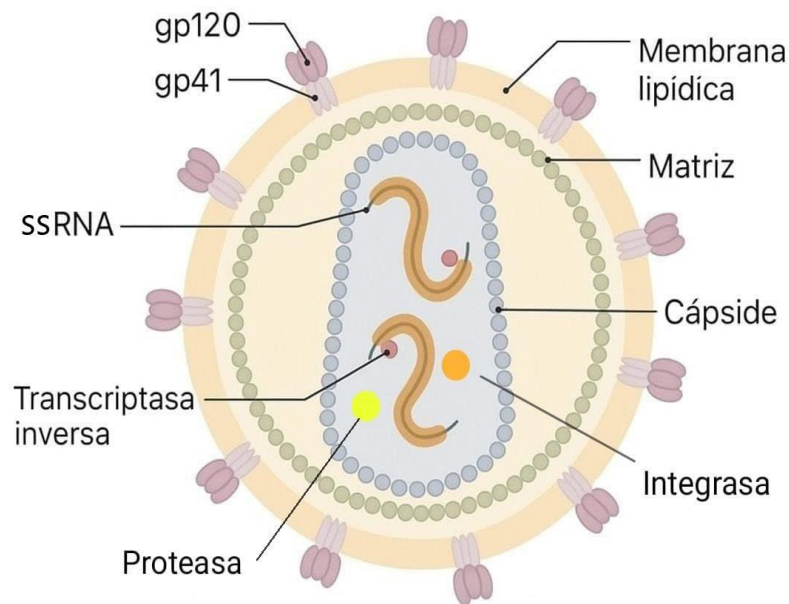
#### 1.1. Descubrimiento y relevancia epidemiológica del VIH:

En 1980 fueron reportados al Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) los primeros casos de neumonías atípicas causadas por *Pneumocystis carinii* (actualmente conocido como *Pneumocystis jirovecii*) provenientes de distintos hospitales de la ciudad de Los Ángeles, EE. UU. Los casos fueron descritos en varones homosexuales jóvenes, algunos de los cuales presentaban manifestaciones clínicas asociadas a citomegalovirus (CMV) y candidiasis. Al poco tiempo de informados estos casos comenzaron a relevarse casos similares en otras ciudades de EE. UU y Europa. Dadas las características clínicas y epidemiológicas de esta enfermedad se la denominó Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El virus de la inmunodeficiencia humana fue aislado por primera vez en el año 1983 en el instituto Pasteur, Francia. En 1984 se desarrollaron los primeros ensayos serológicos (ELISA) para detectar anticuerpos contra el VIH en sangre, lo que permitió comenzar con los programas de tamizaje de donaciones sanguíneas, reduciendo la transmisión por transfusiones además del diagnóstico temprano de personas infectadas. En el año 1987 se aprobó como posible tratamiento el uso de AZT (zidovudina), el primer antirretroviral que inhibe la transcriptasa reversa del virus, se implementó su uso en embarazadas para reducir la transmisión vertical y se introdujo además la PCR como herramienta diagnóstica. En la década de 1990-2000 se desarrollaron inhibidores de las proteasas dando origen a la terapia antirretroviral de gran actividad (HAART) logrando reducir la carga viral a niveles indetectables y mejorar la expectativa de vida. Desde el 2000 en adelante se implementaron las pruebas de resistencia genética para adaptar el tratamiento a las mutaciones virales y el tratamiento se volvió universal, considerándose al VIH una enfermedad crónica controlable. En la actualidad, las estrategias se han focalizado en la eliminación del estigma, la detección temprana y la adherencia al tratamiento.

#### 1.2. Estructura, características y transmisión del virus:

El virus de la inmunodeficiencia humana pertenece al género *Lentivirus* dentro de la familia *Retroviridae*, perteneciente a la clase VI de Baltimore, como todo retrovirus se caracteriza por poseer una enzima transcriptasa reversa capaz de sintetizar ADN a partir de ARN viral. El genoma del VIH está formado por dos moléculas de ARN monocatenario, idénticas, de

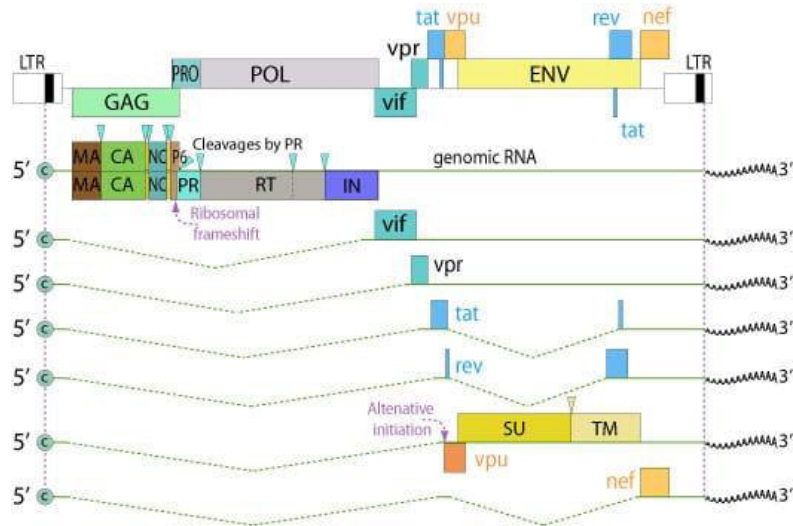
polaridad positiva. La partícula viral madura posee simetría icosaédrica; se trata de un virus envuelto ya que presenta una envoltura externa, formada por una membrana bilipídica que proviene de la membrana plasmática de la célula huésped en la que ha replicado. En esta capa externa o envoltura se insertan las glucoproteínas gp120 (glucoproteína de superficie) y gp41 (glucoproteína transmembrana) encargadas de llevar a cabo el proceso de adherencia mediada por receptor a la célula diana. La cara interna de la envoltura se encuentra tapizada por la proteína matriz p17 que se une a la gp 41 y le confiere estabilidad a la envoltura. Hacia adentro se encuentra la cápside, de simetría icosaédrica formada por la proteína p24 y, por último, en la capa interna se encuentra la nucleocápside que contiene el genoma viral, la nucleoproteína p7 y enzimas proteasa, integrasa y transcriptasa reversa (**Imagen 1**).



**Imagen 1:** Estructura del VIH.

Además de los tres genes estructurales característicos de los retrovirus env (codifica para las proteínas de envoltura), gag (codifica proteínas de la cápside viral) y pol (codifica para las enzimas virales transcriptasa reversa, integrasa y proteasa), presenta una serie de genes reguladores (tat, rev) que codifican para proteínas que aumentan la transcripción del ARN viral y regulan su expresión determinando así la síntesis de las proteínas imprescindibles en la replicación viral y por último, poseen genes accesorios (nef, vif, vpr, vpu, vpx y tev) que codifican para proteínas cuya función está relacionada con el aumento de la infectividad y la liberación de las partículas virales <sup>1</sup>. Otra característica del genoma viral del VIH es que esta flanqueado a ambos lados por secuencias repetitivas denominadas LTR (Long terminal repeats)

que contienen los sitios de interacción con proteínas celulares que pueden activar la transcripción viral (**Imagen 2**).



**Imagen 2:** Genoma del VIH.

La transmisión del VIH ocurre por medio del contacto con fluidos corporales infectados como: sangre, líquido preseminal, semen, flujo vaginal y leche materna. Las vías de contagio más frecuentes son <sup>2</sup>:

- Vía sexual: es la principal forma de contagio a nivel mundial por relaciones sexuales heterosexuales o homosexuales sin uso de métodos de barrera (preservativo, condón o profiláctico).
- Vía sanguínea: por exposición directa a sangre al compartir agujas para el uso de drogas, elementos cortopunzantes infectados.
- Vía parenteral o vertical: de madre a hijo durante el embarazo, parto o lactancia en caso de no recibir el tratamiento y atención médica adecuada. Es la principal vía de transmisión del VIH en niños.

El riesgo de transmisión depende de la cantidad de células infectadas en los fluidos nombrados anteriormente, de la concentración de viriones libres, el tipo de exposición y la presencia de otras enfermedades de transmisión sexual.

### 1.3. Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana comprende una serie de etapas mediante las cuales éste invade la célula hospedera, utiliza su maquinaria para multiplicarse y generar nuevas partículas virales infectivas. Este proceso es fundamental para comprender la patogénesis de la enfermedad y el mecanismo de acción de los fármacos antirretrovirales.

Etapas de la replicación del VIH <sup>1,3</sup> (**Imagen 3**):

- **Entrada del virus a la célula:** la adhesión del VIH a la célula blanco esta mediada por interacciones de alta afinidad entre la molécula CD4 (presente en abundancia en la superficie de la célula blanco como los linfocitos T inmaduros y linfocitos T helpers – CD4+) y la glicoproteína 120; esta interacción induce un cambio conformacional en la glicoproteína de envoltura gp41 que expone el péptido de fusión permitiendo su interacción con el correceptor CCR (receptor de quimioquinas) induciendo la fusión de la envoltura viral con la membrana celular y permitiendo la internalización de la cápside viral al citoplasma.
- **Transcripción inversa e integración:** tras la entrada del virus se produce la liberación del genoma viral en el citoplasma celular y se inicia la transcripción catalizada por la transcriptasa reversa que forma ADN a partir del ARN viral. Este ADN proviral sintetizado es transportado al núcleo para integrarse en el genoma de la célula por acción de la integrasa viral.
- **Síntesis y procesamiento del ARN:** en esta etapa son esenciales dos proteínas virales, por un lado, la proteína Tat, que se trata de un activador de la transcripción, y por otro lado la proteína Rev, que codifica para una proteína que facilita el transporte de los ARN mensajeros (mRNA) desde el núcleo al retículo endoplásmico donde son traducidos a proteínas por los ribosomas celulares.
- **Traducción y maduración:** una vez sintetizadas tanto las proteínas virales como el genoma viral éstos se encuentran en la membrana celular, lugar donde ocurre el ensamblaje de la partícula viral inmadura y su posterior gemación, proceso por el cual obtiene la envoltura a partir de la membrana plasmática de la célula huésped. Finalmente, por acción de la proteasa viral, que cliva las poliproteínas precursoras, se produce la maduración del virión dando lugar a partículas virales completamente infectivas capaces de iniciar un nuevo ciclo replicativo. Dado que la acción de la



viral, y el receptor CD4 de la superficie celular. Una vez dada esta interacción, es necesaria la presencia de un correceptor, principalmente CCR5 o CXCR4, para que ocurra la fusión con la membrana celular mediante la acción de la glicoproteína gp41 que expone el péptido de fusión<sup>6</sup>.

Las cepas virales se diferencian según su uso de correceptores: las cepas R5 utilizan el correceptor CCR5 y predominan en las etapas iniciales de la infección, afectando principalmente a macrófagos y linfocitos de memoria, mientras que las cepas X4, que utilizan CXCR4, aparecen en fases más avanzadas y están asociadas con la destrucción acelerada de los linfocitos T CD4+ y por lo tanto una progresión más rápida hacia el SIDA<sup>5</sup>.

El proceso patogénico del VIH es multifactorial e involucra diversos mecanismos de daño celular entre los cuales se encuentran: citólisis directa durante la liberación de nuevas partículas virales, la fusión celular con formación de sincitios multinucleados, apoptosis inducida en células infectadas o no infectadas mediada por proteínas virales como gp120 o Tat y la activación inmunológica crónica, que lleva al agotamiento de linfocitos T, disminución de células dendríticas y alteración de la homeostasis inmunológica<sup>7;8</sup>.

Con el tiempo, la destrucción de linfocitos CD4+ supera su capacidad de regeneración, lo que produce un descenso en el recuento de CD4+ en sangre periférica. Este recuento constituye el principal marcador clínico del estado inmunológico del paciente y se utiliza para evaluar la progresión de la enfermedad y la necesidad de modificar o no el tratamiento antirretroviral<sup>9</sup>.

El resultado final es un estado de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en el cual el organismo pierde la capacidad de defensa frente patógenos o de controlar la proliferación celular anormal, los pacientes quedan así expuestos a infecciones oportunistas y a neoplasias características como los linfomas no Hodgkin<sup>10</sup>.

### 1.5. Efectos del VIH sobre la hematopoyesis

Las alteraciones hematológicas constituyen una de las manifestaciones clínicas más frecuentes en los pacientes infectados por el VIH y reflejan el impacto directo e indirecto del virus sobre la médula ósea y la hematopoyesis. Estas alteraciones pueden afectar simultáneamente a las tres líneas celulares: eritroide, mieloide y megacariocítica, y su presencia se asocia directamente con la progresión de la enfermedad y con los niveles de linfocitos T CD4+<sup>4</sup>.

El VIH puede alterar la hematopoyesis a través de distintos mecanismos. En primer lugar, la infección crónica genera un estado inflamatorio persistente caracterizado por la liberación de

citoquinas proinflamatorias como la IL-6, la IL-1  $\beta$ , el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el interferón gamma (IFN-  $\gamma$ ), las cuales inhiben la proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos <sup>11</sup>.

Entre las alteraciones más relevantes se encuentran:

- Serie eritroide: la anemia es la alteración hematológica observada con mayor frecuencia en la infección por VIH, su etiología es multifactorial e involucra mecanismos inflamatorios, efectos tóxicos propios de la terapia antirretroviral, deficiencias nutricionales y disfunción medular. En particular, la acción de la IL-6 induce un aumento en la producción de Hecpidina, importante regulador de la homeostasis del hierro, lo que causa la retención de hierro dentro de los macrófagos y enterocitos, lo que finalmente conduce a una disminución de la concentración de hierro sérico y por consiguiente la disminución en la producción de hemoglobina. Por otro lado, IL 1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ : inhiben la producción de Eritropoyetina (EPO) interfiriendo con la proliferación de las células precursoras de eritrocitos. En cuanto a los efectos tóxicos propios de la terapia antirretroviral, se observó que la zidovudina (AZT) se asocia a anemia macrocítica por interferencia en la síntesis de ADN y maduración eritroide <sup>11</sup>.
- Serie mieloide: está caracterizada por la presencia de leucopenia, más específicamente la neutropenia que puede observarse en distintos estadios de la infección y está asociada a la destrucción de linfocitos T y a la supresión de progenitores mieloides por acción de las citoquinas inflamatorias.
- Serie megacariocítica: la trombocitopenia es otra de las complicaciones frecuentes de la infección por VIH. Puede presentarse tanto en etapas tempranas como en fases avanzadas de la enfermedad y se debe a distintos mecanismos patogénicos como destrucción inmunológica de las plaquetas, disminución de la producción medular y alteración del microambiente megacariocito <sup>11</sup>. En el extendido de sangre periférica es común observar plaquetas grandes que son el reflejo de una respuesta compensatoria medular <sup>10</sup>.

En síntesis, las alteraciones hematológicas descritas reflejan el impacto del VIH sobre el microambiente de la medula ósea y por consiguiente sobre la hematopoyesis. Dado que su frecuencia y severidad se relacionan directamente con el recuento de linfocitos T CD4+ el análisis hematológico constituye una herramienta fundamental para el seguimiento del paciente.

## **2. Proceso de hematopoyesis** <sup>12</sup>

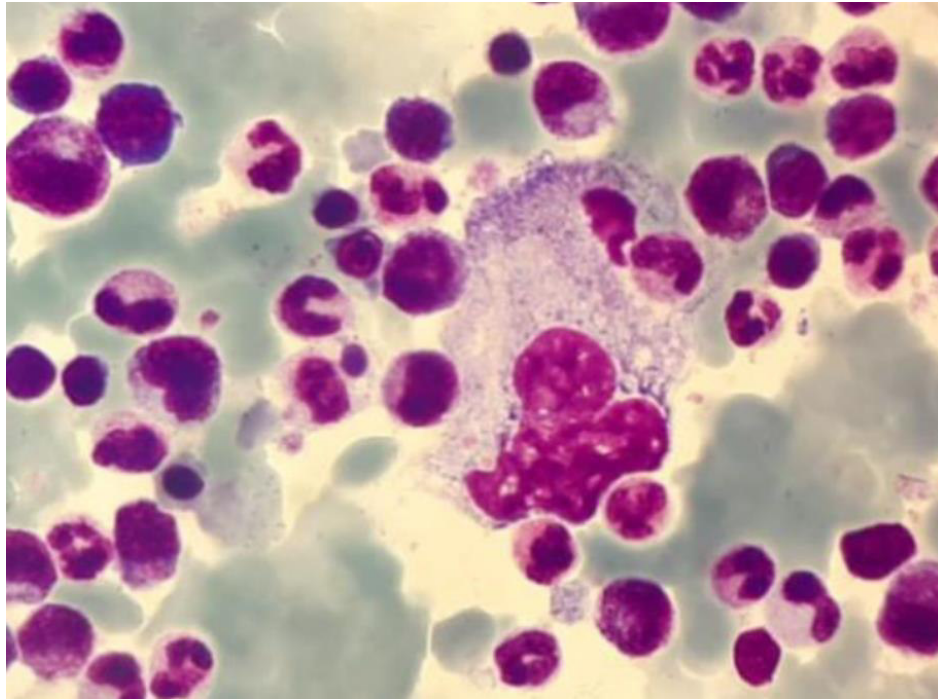
La hematopoyesis es el mecanismo fisiológico por el cual se lleva a cabo la formación continua de los distintos tipos de elementos formes de la sangre, que los mantiene dentro de los límites normales en la sangre periférica.

En el adulto, la hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea roja de los huesos planos, mientras que en su etapa embrionaria y fetal se desarrolla por etapas en el saco vitelino, hígado y bazo. A partir del nacimiento, la médula ósea se consolida como el principal órgano hematopoyético.

Este proceso se origina a partir de las células madre hematopoyéticas caracterizadas por ser pluripotentes por lo cual poseen la capacidad de autorrenovarse, proliferar y diferenciarse, dando origen a células de todas las líneas somáticas. Estas células se encuentran en un ambiente especializado, el microambiente medular, formado por un conjunto de sustancias químicas, hormonales y diferentes tipos celulares, entre ellos células endoteliales, linfocitos T, macrófagos, células reticulares y adipocitos. Cada tipo celular se desarrolla en un microambiente específico de la médula, denominado nicho, que está formado por los elementos del microambiente que brindan soporte físico y adhesión a las células. Uno de los factores más importantes para el desarrollo de las células hematopoyéticas son los factores de crecimiento, que actúan sobre la proliferación, maduración y función celular, estos incluyen la EPO encargada de estimular la eritropoyesis, trombopoyetina (TPO) que regula la formación de plaquetas, los factores estimulantes de colonias (FEC) responsables de la producción de granulocitos y monocitos, y por último, las interleuquinas (IL), principalmente las IL-3 e IL-6, que actúan como moduladores del crecimiento y maduración de las diferentes líneas celulares.

Las Células Madre Hematopoyéticas (HSC) generan dos grandes progenitores (**Imagen 4**)

- Progenitor mieloide común: de él derivan las líneas eritroide, megacariocítica, granulocítica y monocítica.
- Progenitor linfoide común: da origen a los linfocitos T, B y células NK.



**Imagen 4:** Médula ósea normal. Se observa un megacariocito central y diferentes precursores hematopoyéticos

### **3. Evaluación hematológica en el laboratorio clínico**

#### 3.1. Importancia del estudio hematológico en pacientes VIH positivos:

El estudio hematológico es una herramienta diagnóstica esencial en la práctica clínica y, por lo tanto, también lo es su aplicación en los pacientes infectados por el VIH. Como ya vimos, a lo largo de la evolución de la enfermedad, el sistema hematopoyético puede sufrir múltiples alteraciones ya sea a causa de la acción directa del virus sobre la médula ósea o por acción de factores inmunológicos, nutricionales y farmacológicos asociados al tratamiento. El estudio del hemograma completo y la observación de la morfología celular por medio del extendido de sangre periférica permiten detectar las anomalías, diagnosticar y hacer un seguimiento del estado hematológico del paciente <sup>10</sup>.

#### 3.2. Hemograma, parámetros hematológicos de rutina:

El hemograma completo, es una de las pruebas más solicitadas en el laboratorio de análisis clínicos ya que aporta valiosa información sobre la homeostasis de un individuo. A lo largo de los años, esta prueba ha evolucionado desde métodos manuales tradicionales hasta sistemas de automatizados de cuarta generación, que combinan tecnologías ópticas, electrónicas y computacionales para brindar resultados más precisos y reproducibles.

Podemos definir al hemograma con un conjunto de exámenes que evalúan, de forma cualitativa y cuantitativa, los diferentes elementos celulares de la sangre periférica (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). Los principales parámetros incluyen el recuento eritrocitario, la hemoglobina, el hematocrito y los índices hematimétricos: Volumen Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM), Concentración Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM), los cuales permiten clasificar las anemias. También se evalúa el recuento de leucocitos y la fórmula leucocitaria, la amplitud de distribución eritrocitaria (RDW) y el recuento plaquetario, parámetros que reflejan la capacidad inmunológica y la integridad del sistema hematopoyético<sup>13</sup>.

Aunque los autoanalizadores modernos ofrecen una alta exactitud, la observación del extendido de sangre periférica sigue siendo indispensable, ya que permite verificar resultados, detectar artefactos y observar cambios morfológicos sutiles que los autoanalizadores no siempre identifican, por ello, la combinación de ambas metodologías representa el enfoque más completo para la evaluación hematológica<sup>14</sup>.

### 3.3. Anemia: definición, clasificación y mecanismos fisiopatológicos

La anemia es la alteración hematológica más frecuente observada en la infección por VIH, con una prevalencia entre el 30% y el 80% dependiendo del estado clínico del paciente y del tratamiento que recibe<sup>4</sup>. Se define anemia a la disminución de la concentración de hemoglobina en la sangre, por debajo de los valores normales para la edad y sexo independientemente de la concentración de glóbulos rojos<sup>15</sup>.

Según el punto de vista morfológico las anemias pueden clasificarse en: microcíticas, normocíticas o macrocíticas según el volumen corpuscular medio (VCM). Otra forma de clasificación es según criterios fisiopatológicos donde las anemias pueden originarse por una producción deficiente de eritrocitos, una pérdida excesiva de sangre o una destrucción acelerada de los glóbulos rojos.

### 3.4. Evaluación de la morfología celular en sangre periférica:

El estudio de la morfología celular en un extendido de sangre periférica constituye un pilar fundamental en el diagnóstico hematológico. Por medio del examen microscópico de la tinción del frotis sanguíneo, el bioquímico puede analizar de forma cualitativa los elementos formes de la sangre, complementando la información cuantitativa brindada por los autoanalizadores.

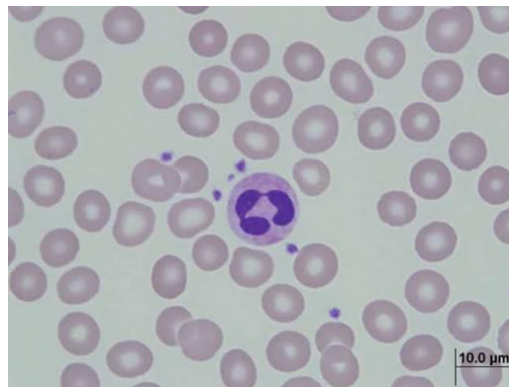
Esta observación directa permite reconocer patrones morfológicos anormales y que orientan hacia el diagnóstico de diversas patologías hematológicas o sistémicas <sup>14</sup>.

#### 3.4.1. Morfología normal de las células sanguíneas (**Imagen 5 y 6**):

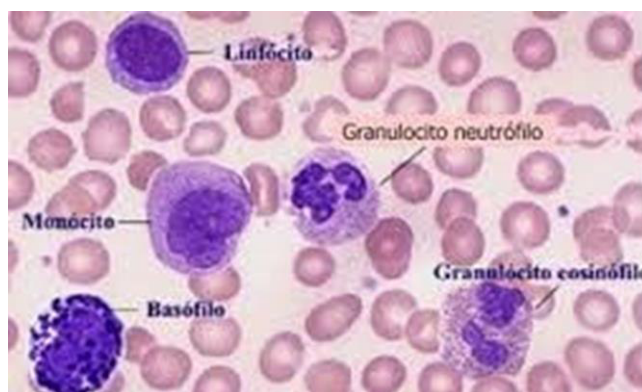
En un extendido normal de sangre periférica, los eritrocitos maduros tienen forma de discos bicóncavos de unos 7 a 8  $\mu\text{m}$  de diámetro, con un centro más claro. Poseen bordes bien definidos y una coloración rosada uniforme con un área central más pálida que representa aproximadamente un tercio del diámetro total. No presentan núcleo ni tampoco inclusiones citoplasmáticas y se distribuyen de forma homogénea en el frotis <sup>16</sup>.

Los leucocitos se encuentran dispersos entre los eritrocitos, en una proporción aproximada de 1 cada 600-700 glóbulos rojos. Se los distingue entre sí por su tamaño, morfología nuclear, coloración del citoplasma y presencia de gránulos. Los neutrófilos segmentados son los más abundantes, tienen como característica principal un núcleo multilobulado y citoplasma ligeramente rosado con gránulos. Los linfocitos están caracterizados por presentar un núcleo redondo, intensamente teñido y que ocupa casi todo el citoplasma celular teñido de azul. En cuanto a los monocitos, éstos son de mayor tamaño, con un núcleo arrañonado y citoplasma gris azulado con fina granulación. Los eosinófilos, poseen un núcleo bilobulado y presentan gránulos grandes de color anaranjados mientras que los basófilos presentan gránulos gruesos de color violeta oscuro que pueden ocultar el núcleo <sup>16</sup>.

Por otro lado, las plaquetas se observan como pequeñas estructuras discoideas, de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, teñidas de azul grisáceo con gránulos purpura. En condiciones normales, suelen estar distribuidas de manera uniforme, sin formar acúmulos y en un número de 7 a 15 por campo 100X.



**Imagen 5:** Extendido de sangre periférica normal. Se observan eritrocitos, neutrófilo central y plaquetas.



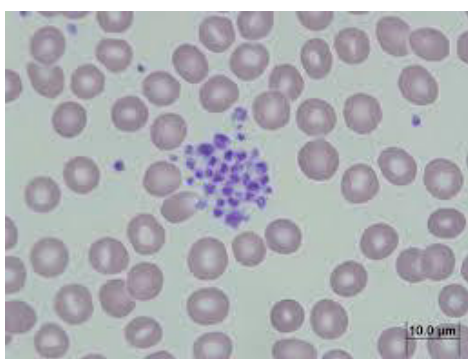
**Imagen 6:** Extendido de sangre periférica normal. Se observan eritrocitos, neutrófilo, linfocito, eosinófilo, basófilo, monocitos y plaquetas.

### 3.4.2. Alteraciones morfológicas en pacientes VIH positivos:

En la serie eritrocitaria, la alteración más frecuente es la anisocitosis, acompañada de poiquilocitosis, rouleaux o apilamiento de eritrocitos y policromasia (aumento de tinción en el fondo), pero también pueden observarse esferocitos, dianocitos y/o estomatocitos <sup>16</sup>.

En la serie leucocitaria, los pacientes infectados con VIH presentan, frecuentemente, cambios displásicos en los neutrófilos incluyendo formas nucleares atípicas, relación núcleo/ citoplasma aumentado, hipogranulación y fragmentación nuclear, además pueden presentar granulación toxica, cuerpos de Döhle, vacuolas citoplasmáticas y desplazamiento hacia la izquierda o left shift haciendo referencia a la presencia de células inmaduras en sangre periférica. La característica displásica más específica de los neutrófilos es la presencia de fragmentos nucleares desprendidos, sin embargo, no se trata de la característica más frecuente.

En cuanto a la serie plaquetaria, éstas pueden tender a agruparse (**Imagen 7**) o presentarse en forma de plaquetas gigantes, lo que sugiere una producción medular compensatoria.



**Imagen 7:** Acumulo de plaquetas observado en extendido de sangre periférica.

### 3.5. Preparación del extendido de sangre periférica y técnicas de coloración:

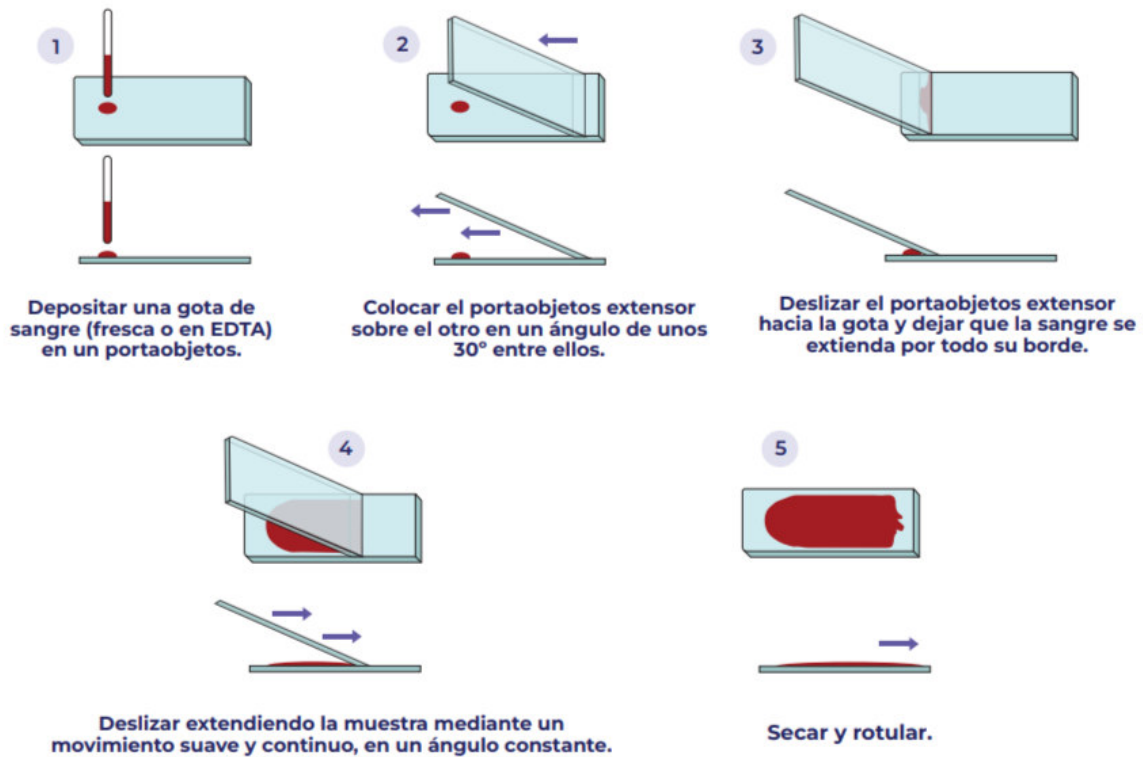
La preparación del frotis sanguíneo y su correcta tinción constituyen pasos fundamentales para la evaluación de la morfología de las células sanguíneas. Un extendido bien realizado y teñido de forma correcta permite identificar con claridad las características estructurales de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, posibilitando un diagnóstico hematológico confiable <sup>16;17</sup>.

#### 3.5.1. Preparación del extendido de sangre periférica:

La muestra ideal para preparar el frotis sanguíneo es a partir de una gota de sangre de punta de aguja en el momento de la extracción. También puede realizarse a partir de sangre fresca, anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) di o tri potásico, dentro de las dos horas posteriores a la toma de la muestra para evitar alteraciones morfológicas <sup>18</sup>.

**Procedimiento (Imagen 8):** se coloca una pequeña gota de sangre a aproximadamente a 1 cm de uno de los extremos de un portaobjetos limpio y desengrasado. Con ayuda de un segundo portaobjetos, usado como extensor, se lo coloca frente a la gota en ángulo de 30° con el portaobjetos y se lo desliza hacia atrás hasta que haga contacto con la sangre. La gota debe extenderse rápidamente a lo largo de la línea de contacto, posteriormente, se realiza un movimiento uniforme y continuo hacia adelante, extendiendo la gota a lo largo del portaobjetos hasta formar una película delgada. El grosor de la extensión se puede regular variando la presión y velocidad a la que se realiza y cambiando el ángulo en el que se aplica el extensor.

El objetivo es obtener un frotis con una zona de lectura adecuada que conste de una capa de células distribuidas uniformemente, sin grumos, con una terminación en forma de “lengua”. El grosor ideal es aquel en el que se puede ver al microscopio un leve solapamiento de los hematíes en la mayor parte de la longitud del extendido, además los leucocitos deben ser fácilmente reconocibles a lo largo de casi toda la extensión. Los extendidos deben secarse al aire libre o haciendo uso de una corriente de aire caliente en caso de ambientes húmedos <sup>17</sup>.



**Imagen 8:** Método manual para preparación de extendido de sangre periférica.

### 3.5.2. Técnicas de tinción:

En hematología, las coloraciones más empleadas son las de tipo Romanowsky, ya que proporcionan una excelente diferenciación entre los componentes celulares. El fundamento de estas tinciones se basa en la interacción entre un colorante básico (Azure B o azul de metileno) y un colorante ácido (eosina Y), los cuales generan una amplia gama de tonalidades intermedias según la afinidad de cada estructura celular.

Entre las variantes más utilizadas se encuentran May-Grünwald -Giemsa (MGG), Wright-Giemsa y Leishman. La tinción MGG es particularmente útil en el diagnóstico morfológico de anemia, leucemia y alteraciones plaquetarias por su nitidez y contraste.

Las tinciones de Romanowsky, correctamente realizadas, revelan detalles que permiten distinguir con precisión las diferentes líneas celulares <sup>19</sup>:

- Eritrocitos: adquieren una coloración rosada más intensa en la periferia que en el centro a causa de su grosor y forma bicóncava.
- Neutrófilos: muestran un núcleo violeta oscuro, citoplasma rosa pálido y gránulos finos basófilos.

- Eosinófilos: su núcleo se tiñe de violeta y citoplasma anaranjado con gránulos.
- Linfocitos: presentan núcleo redondo azul oscuro y citoplasma azul pálido
- Plaquetas: se observan azul- grisáceas con gránulos basófilos violetas.

## TRABAJO DE CAMPO

### 1. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue estudiar qué tinción de tipo Romanowsky, Metanol -Giemsa ó May-Grünwald- Giemsa permite una mejor visualización, caracterización y valor diagnóstico de las alteraciones hematológicas en extendidos de sangre periférica de pacientes VIH positivos.

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se recopiló información de 7 pacientes con serología positiva para VIH, a los cuales se les realizó una extracción sanguínea para su control semestral que consiste en un hemograma y carga viral. A cada paciente se le realizó 2 extendidos de sangre periférica en el momento de la extracción (A y B). Los extendidos A fueron coloreados con la tinción May Grünwald–Giemsa (MGG), mientras que los extendidos B fueron coloreados con la técnica de Metanol –Giemsa (MG).

En la tinción MGG, los extendidos A fueron cubiertos por colorante May Grünwald por 5 minutos, se enjuagaron con agua de la canilla y luego se cubrieron con Giemsa previamente diluido al 10% durante 20 minutos. En la tinción MG, los extendidos B fueron cubiertos con Metanol por 5 minutos, se enjuagaron con agua de la canilla y luego se cubrieron con Giemsa previamente diluido al 10% durante 20 minutos.

Los hemogramas fueron procesados en un contador hematológico de 3 poblaciones Mindray BC-20. Las cargas virales fueron acondicionadas para su procesamiento en otro centro de alta complejidad.

Los extendidos fueron analizados en un microscopio óptico marca Arcano con objetivo 400X y 1000X para la visualización y caracterización de la morfología sanguínea.

Los datos fueron recopilados y analizados en planilla Excel.

### 3. RESULTADOS

En la **tabla 1** se muestran los resultados de los hemogramas de cada paciente procesados el día de la extracción.

Referencias: **RBC:** Recuento de glóbulos rojos, expresados  $\times 10^6/\mu\text{L}$ ; **WBC:** Recuento de glóbulos blancos, expresado  $\times 10^3/\mu\text{L}$ ; **HGB:** Concentración de Hemoglobina, expresada en g/dL; **HCT:** Hematocrito, expresado en %; **VCM:** Volumen Corpuscular Medio, expresado en

fL; **HCM**: Hemoglobina Corpuscular Media, expresada en pg; **CHCM**: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media, expresada en g/dL; **RDW**: ancho de distribución eritrocitaria, expresada en %; **PLT**: recuento de Plaquetas, expresado x10<sup>3</sup>/uL

**Tabla 1**

	<b>RBC</b>	<b>WBC</b>	<b>HGB</b>	<b>HCT</b>	<b>VCM</b>	<b>HCM</b>	<b>CHCM</b>	<b>RDW</b>	<b>PLT</b>
<b>Pac. 1</b>	4.22	6.00	13.3	38.2	90.6	31.6	34.8	12.8	262
<b>Pac. 2</b>	4.00	4.72	11.8	35.7	89.3	29.6	33.1	13.0	314
<b>Pac. 3</b>	4.14	8.17	14.1	42.4	102.3	34.1	33.3	14.3	407
<b>Pac. 4</b>	5.09	3.33	14.7	43.8	86.1	28.9	33.6	14.5	217
<b>Pac. 5</b>	5.05	6.45	15.1	46.3	91.6	30.0	32.6	12.8	174
<b>Pac. 6</b>	4.8	6.55	15.1	44.9	92.3	31.0	33.6	14.6	208
<b>Pac. 7</b>	4.7	7.20	11.0	34.9	73.6	23.4	31.5	16.8	432

En la **tabla 2** se muestran los resultados de las cargas virales, expresadas en copias/mL y en Log.

**Tabla 2**

	<b>Carga viral (copias/mL)</b>	<b>Log</b>
<b>Pac. 1</b>	< 40	< 1.60
<b>Pac. 2</b>	43	1.70
<b>Pac. 3</b>	< 40	< 1.60
<b>Pac. 4</b>	< 40	< 1.60
<b>Pac. 5</b>	< 40	< 1.60
<b>Pac. 6</b>	< 40	< 1.60
<b>Pac. 7</b>	75955	4.88

En la **tabla 3** se muestra la fórmula leucocitaria obtenida por el contador hematológico y la visualizada mediante análisis microscópico en MGG (A) y MG (B). Los datos fueron expresados en %.

Referencias: **N**: neutrófilos, **L**: linfocitos, **E**: eosinófilos, **B**: basófilos, **M**: monocitos

**Tabla 3**

	<b>Mindray BC-20</b>	<b>MGG (A)</b>	<b>MG (B)</b>
<b>Pac. 1</b>	N:51.3, L:39.4, M:9.3	N:57, L:37, E:4, B:0, M:2	N:58, L:36, E:3, B:0, M:3
<b>Pac. 2</b>	N:61.4, L:32.0, M:6.6	N:60, L:35, E:1, B:0, M:4	N:57, L:36, E:3, B:0, M:4
<b>Pac. 3</b>	N:72.5, L:22.5, M:5.0	N:60, L:33, E:2, B:0, M:5	N:65, L:30, E:1, B:0, M:4
<b>Pac. 4</b>	N:50.9, L:42.7, M:6.4	N:41, L:50, E:6, B:0, M:3	N:35, L:55, E:8, B:0, M:2
<b>Pac. 5</b>	N:62.4, L:29.3, M:8.3	N:60, L:35, E:5, B:0, M:1	N:57, L:34, E:5, B:0, M:4
<b>Pac. 6</b>	N:47.4, L:44.7, M:7.9	N:46, L:43, E:5, B:0, M:6	N:47, L:42, E:2, B:0, M:9
<b>Pac. 7</b>	N:54, L:36, M:10	N:49, L:35, E:2, B:0, M:14	N:48, L:38, E:2, B:0, M:12

En la **tabla 4** se muestran las características microscópicas visualizadas en cada extendido (A y B).

**Tabla 4**

	<b>MGG (A)</b>	<b>MG (B)</b>
<b>Pac. 1</b>	Monocitos vacuolados, eosinófilos con gránulos rosados, GR normocrómicos-normocíticos, plaquetas de coloración violeta intenso	Monocitos sin vacuolas, eosinófilos con gránulos anaranjados, GR normocrómicos-normocíticos, plaquetas de coloración rosa pálido
<b>Pac. 2</b>	Se observa hipocromía, ovalocitos, esferocitos, monocitos vacuolados, eosinófilos con gránulos anaranjados, plaquetas con gránulos violetas intenso.	No se observa hipocromía, ovalocitos, esferocitos, monocitos con menos vacuolas, eosinófilos con gránulos rosados pálidos, plaquetas con gránulos rosa pálidos.
<b>Pac. 3</b>	Se observan dianocitos, neutrófilos polisegmentados, monocitos vacuolados, eosinófilos con gránulos anaranjados. Plaquetas con gránulos violetas intenso.	Se observan dianocitos, neutrófilos polisegmentados, monocitos vacuolados, eosinófilos con gránulos rosados pálidos y plaquetas con gránulos rosa pálidos.
<b>Pac. 4</b>	Monocitos sin vacuolas, eosinófilos con gránulos anaranjados, acúmulos de plaquetas con gránulos violetas intenso.	Monocitos sin vacuolas, eosinófilos con gránulos rosados pálidos, acúmulos de plaquetas con gránulos rosa pálidos.
<b>Pac. 5</b>	Monocitos vacuolados, eosinófilos con gránulos anaranjados, acúmulos de plaquetas con gránulos violetas intenso.	Monocitos vacuolados, eosinófilos con gránulos rosados pálidos, acúmulos de plaquetas con gránulos rosa pálidos.
<b>Pac. 6</b>	Monocitos vacuolados, eosinófilos con gránulos anaranjados, plaquetas con gránulos violetas intenso.	Monocitos con menos vacuolas, eosinófilos con gránulos rosados pálidos, plaquetas con escasa granulación.
<b>Pac. 7</b>	Moderada hipocromía, microcitos, ovalocitos, monocitos sin vacuolas, eosinófilos con gránulos anaranjados, plaquetas grandes (macroplaquetas)	Moderada hipocromía (menos marcada), microcitos, ovalocitos, eosinófilos con gránulos rosados más tenues, plaquetas con coloración rosada

#### **4. DISCUSIÓN**

En este estudio se compararon dos técnicas de tinción de tipo Romanowsky, May Grünwald-Giemsa (MGG) y Metanol- Giemsa (MG), con el objetivo de evaluar cómo se observa la morfología celular en sangre periférica de pacientes con infección por VIH. A pesar de que el número de muestras fue reducido, las diferencias entre ambas tinciones pudieron observarse con claridad y permitieron comparar aspectos morfológicos con cada una de ellas.

En general, ambas tinciones permitieron identificar correctamente los elementos formes y reconocer las alteraciones hematológicas más frecuentes en personas infectadas con el virus del VIH, tales como anisocitosis, microcitosis, hipocromía, variaciones en la forma eritrocitaria, macroplaquetas y monocitos vacuolados, que son hallazgos que coinciden con lo descrito en la literatura <sup>4;10;11</sup>. Sin embargo, la intensidad de la coloración, el contraste y la definición de las estructuras celulares no fueron iguales en ellas.

La tinción MGG mostró coloraciones más intensas con un contraste más marcado. Los eosinófilos presentaron su granulación anaranjada característica, las plaquetas mostraron gránulos violetas bien definidos y las vacuolas en los monocitos se observaron con mayor claridad. Estos resultados coinciden con las descripciones de los autores Campuzano Maya y Bain, quienes señalan que el uso del colorante May- Grünwald como primer paso mejora la fijación y resalta los detalles citoplasmáticos.

Una de las diferencias más evidente, durante la observación microscópica de los extendidos de sangre, fue la facilidad para identificar los eosinófilos. En las muestras teñidas con MGG, los eosinófilos pudieron ser reconocidos de manera inmediata y sin dudas gracias a la coloración anaranjada intensa característica de sus gránulos citoplasmáticos. En cambio, en la misma muestra coloreada con MG, la granulación se visualizó más rosada y tenue. Esto hizo que no resaltaran a primera vista, haciendo más dificultosa su identificación; si bien se lograron identificar por el núcleo bilobulado característico, la menor intensidad de color en relación con el MG hizo que llevara más tiempo reconocerlos, influyendo en la fluidez y el tiempo para realizar el recuento de la fórmula leucocitaria.

También se tuvo en cuenta la posibilidad de confundir los eosinófilos con neutrófilos hiposegmentados al usar la tinción de MG ya que la granulación se veía más pálida y no resaltaba a primera vista. Esto es relevante ya que puede influir directamente en el recuento

diferencial de leucocitos durante la fórmula leucocitaria, sobre todo cuando se trata de un operador inexperto en la visualización de extendidos sanguíneos. Con MGG esta confusión no se presentó porque el color anaranjado intenso de los gránulos facilita la distinción inmediata.

Otra diferencia importante se vio en la hipocromía de la serie roja. Tanto en la muestra del paciente 2 como del paciente 7, la hipocromía se apreció claramente con MGG, ya que el halo central y la palidez del eritrocito se distinguieron sin dificultad. Justamente, se trató de dos pacientes cuyas cargas virales resultaron positivas. Por otro lado, con MG la hipocromía estaba presente, pero resultó ser menos marcada, visualizándose de forma más tenue. Esto coincide con el comportamiento habitual de ambas técnicas: MGG tiñe con mayor intensidad permitiendo resaltar cambios sutiles, mientras que MG brinda una coloración más pálida.

En cuanto a las plaquetas también se observaron diferencias: con MGG, los gránulos se tiñeron con más intensidad de un tono violáceo definido, mientras que con MG se observaron más pálidos. Ambas técnicas permitieron reconocer macroplaquetas y agregados plaquetarios, pero MGG brinda una imagen más nítida.

Con los monocitos también se observaron diferencias: con MGG, las vacuolas se visualizaron con mayor claridad debido a la intensidad de la coloración. Ya que es frecuente el hallazgo de monocitos con vacuolas en pacientes con VIH, debido a procesos de activación inmunológica, contar con una tinción que permita distinguirlos sin dudas favorece a un resultado más preciso.

Otro aspecto importante para considerar es el costo de los insumos: los reactivos para May-Grünwald tiene un valor aproximado de \$20.963, \$26.680 para Giemsa y \$8.200 para el Metanol. Hay que tener en cuenta que la tinción MGG requiere el uso de ambos colorantes lo que implica un costo mayor en comparación con MG que representa una alternativa más económica. Esto puede ser relevante en laboratorios que cuentan con un presupuesto limitado, o en aquellos centros en lo que esta población de pacientes no es de alta frecuencia.

En conjunto, los resultados de este estudio indican que la tinción MGG brinda una calidad diagnóstica superior, con mejor contraste y definición, facilitando la observación morfológica normal y alterada, así como la identificación certera de los eosinófilos. Esto no quita que la tinción con MG continúa siendo una opción válida y económica para la observación de extendidos de sangre, aunque con algunas limitaciones en la intensidad de la coloración y en la detección de alteraciones que pueden pasarse por alto principalmente en personal con poca experiencia.

## **5. CONCLUSIONES**

La comparación entre las tinciones May-Grünwald-Giemsa y Metanol-Giemsa permitió la evaluación y observación de la morfología sanguínea en pacientes con infección por VIH. Ambas técnicas fueron útiles en la identificación de los elementos formes, aunque las diferencias en la intensidad de la tinción fueron notables.

La tinción MGG proporciona una visualización más clara, facilitada por la intensidad de la coloración, para reconocer más rápidamente ciertas células, como los eosinófilos y observar con mayor precisión alteraciones sutiles en la serie roja, como la hipocromía. Estas diferencias resultan importantes porque una correcta observación de la morfología celular contribuye a realizar una lectura precisa del frotis y por lo tanto un diagnóstico correcto y de calidad para complementar el hemograma.

Por otro lado, la tinción con MG fue más económica, lo que es útil en laboratorios con recursos limitados. Sin embargo, es importante tener presente que su coloración más tenue puede llevar a pasar por alto ciertos detalles, influyendo en la identificación inicial de algunos tipos celulares.

En base a estos resultados puede concluirse que la tinción de MGG es la más adecuada cuando se busca una evaluación detallada y precisa de la morfología, mientras que la tinción de MG puede ser una alternativa para observaciones generales o en contextos donde se prioriza el costo.

Como limitaciones del estudio, el bajo número de pacientes con los cuales se trabajó no permitió realizar un análisis estadístico robusto.

En conclusión, este trabajo destaca que la calidad de la tinción impacta directamente en lo que observamos al microscopio y en la calidad del resultado que se brinda. MGG ofrece una lectura más clara y confiable mientras que MG sigue siendo una alternativa válida cuando se prioriza el costo.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

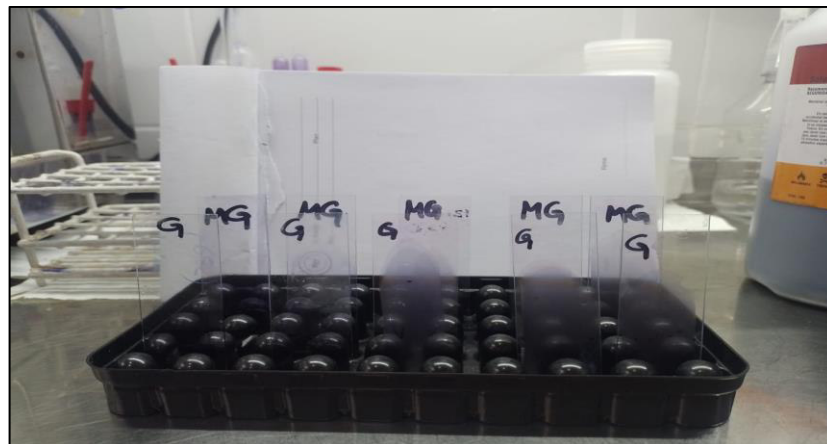
1. Gómez Carrillo, Manuel; Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV - Human Immunodeficiency virus) : Aspectos Viroológicos; Corpus; 2015; 195-201.
2. Fundación Huésped. (s.f.). VIH – Información. Recuperado de <https://huesped.org.ar/informacion/vih-informacion>.
3. Codina, Martin e Ibarra (2002); La infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana; Cap. 21, Tomo 2.
4. Bhardwaj S. et al. (2020). Hematologic derangements in HIV/AIDS patients and their relationship with the CD4 counts: a cross-sectional study. *Int J Clin Exp Pathol*, 13(4): 756–763.
5. Naif, H. M. (2013). Pathogenesis of HIV infection. *Infectious Disease Reports*, 5(Suppl 1), e6.
6. Cicala, C., Arthos, J., & Fauci, A. S. (2011). HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV. *Journal of Translational Medicine*, 9(Suppl 1), S2.
7. Weiss, R. A. (1993). How does HIV cause AIDS? *Science*, 260(5112), 1273–1279.
8. Levy, J. A. (2009). HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS*, 23(2), 139–152.
9. Fauci, A. S., & Lane, H. C. (2020). Human Immunodeficiency Virus Disease: AIDS and Related Disorders. In D. Kasper et al. (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine* (21st ed.). McGraw-Hill.
10. Opie J. et al. (2024). Hematological complications of human immunodeficiency virus (HIV) infection: An update from an HIV-endemic setting. *Open Forum Infectious Diseases*, 11(4), ofae162.
11. Marchionatti, A., & Parisi, S. (2021). Anemia and thrombocytopenia in people living with HIV/AIDS: A narrative literature review. *International Health and Addiction Advances*, 3(6), 1–10.
12. Florenza, L., De Letre, S., & Woessner, W. A. (2004). Hematopoyesis (Cap. 1, pp. 1–31). En C. Sans (Ed.), *Hematología clínica* (5.ª ed.). Médica Panamericana.
13. González M., Suárez J. (2020). Alteraciones hematológicas en pacientes portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). *Conciencia Digital*, 3(1), 253–263.
14. Campuzano Maya, G. A. (2007). El extendido de sangre periférica: técnica, interpretación y correlación clínica. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 64(582), 25–33.

15. Vives-Corróns, J. L. (2004). Anemia: Aspectos generales del diagnóstico (Cap. 5, pp. 131–137). En C. Sans (Ed.), *Hematología clínica* (5.<sup>a</sup> ed.). Médica Panamericana.
16. Bain, B. J. (2015). Capítulo 4. *Blood Cells: A Practical Guide* (5.<sup>a</sup> ed., pp. 50-59). Wiley-Blackwell.
17. Dacie, J. V., & Lewis, S. M. (2006). *Dacie and Lewis Practical Haematology* (10th ed.). Churchill Livingstone/Elsevier.
18. Palmer, L., Briggs, C., McFadden, S., Zini, G., Burthem, J., Rozenberg, G., Proytcheva, M., & Machin, S. J. (2015). ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *International journal of laboratory hematology*, 37(3), 287–303.
19. Instituto de Salud Pública de Chile. (2018). RECOMENDACIONES PARA LA TINCIÓN DE FROTIS SANGUÍNEOS PARA... [Página web]. Obtenido de <https://www.ispch.cl/sites/default/files/RECOMENDACIONES%20PARA%20LA%20TINCI%C3%93N%20DEL%20FROTIS%20SANGU%C3%8DNEO.pdf>.

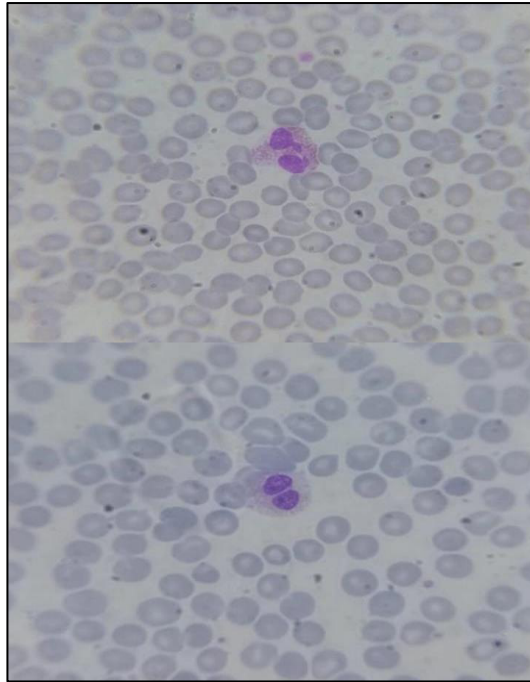
## 7. ANEXO



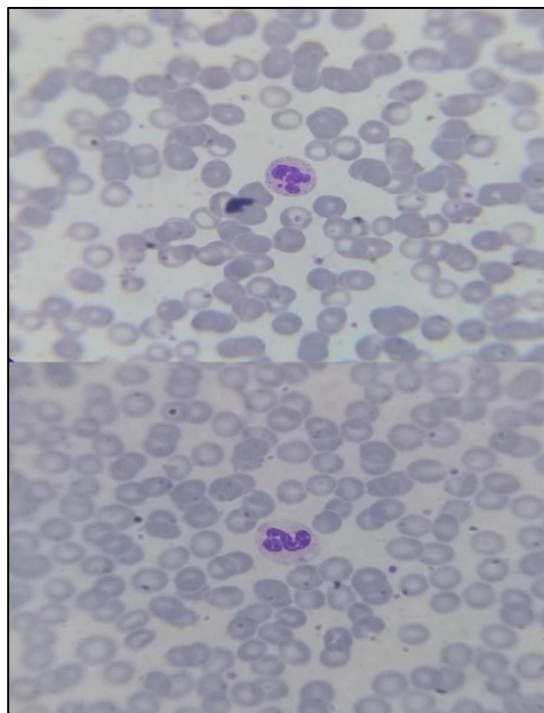
**Imagen A1:** Colorantes May-Grünwald y Giemsa utilizados para la tinción de los extendidos de sangre periférica.



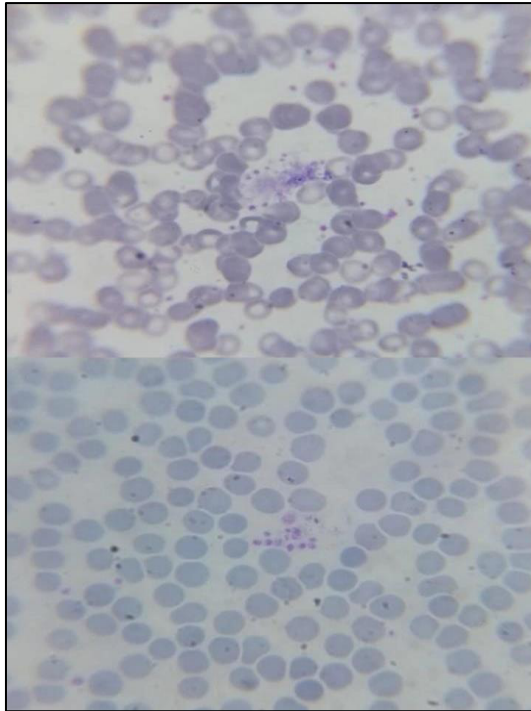
**Imagen A2:** Extendidos sanguíneos, analizados durante el trabajo, coloreados con ambas técnicas de tinción.



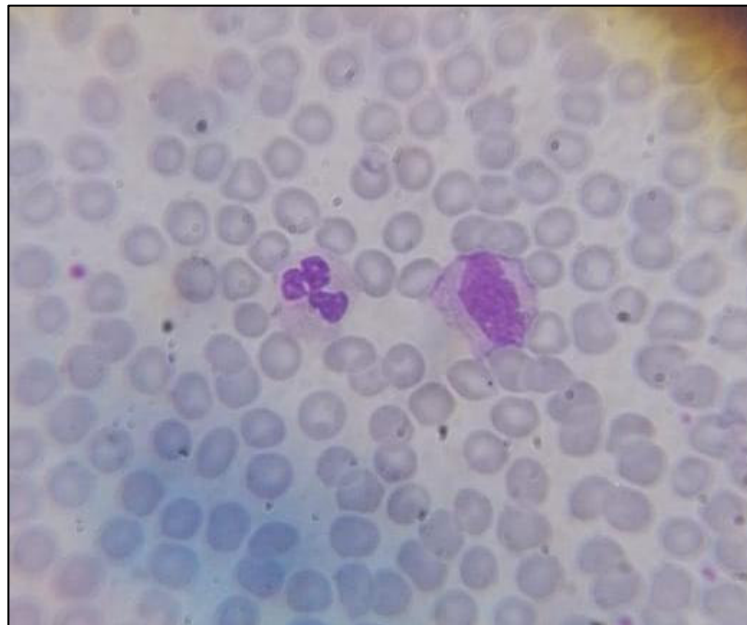
**Imagen A3:** Comparación de eosinófilos en frotis sanguíneo. En la imagen superior se observa un eosinófilo colorado con MGG mientras que en la imagen inferior se observa un eosinófilo coloreado con MG. 100X.



**Imagen A4:** Comparación de neutrófilos en frotis sanguíneo. Imagen superior: neutrófilo polisegmentado coloreado con MGG. Imagen inferior: neutrófilo coloreado con MG. 100X.



**Imagen A5:** Comparación de acumulo de plaquetas. Imagen superior: acumulo de plaquetas coloreadas con MGG. Imagen inferior: Acumulo de plaquetas coloreadas con MG. 100X.



**Imagen A6:** Se observa un neutrófilo polisegmentado y un monocito en extendido de sangre periférica coloreado con MGG. 100X.



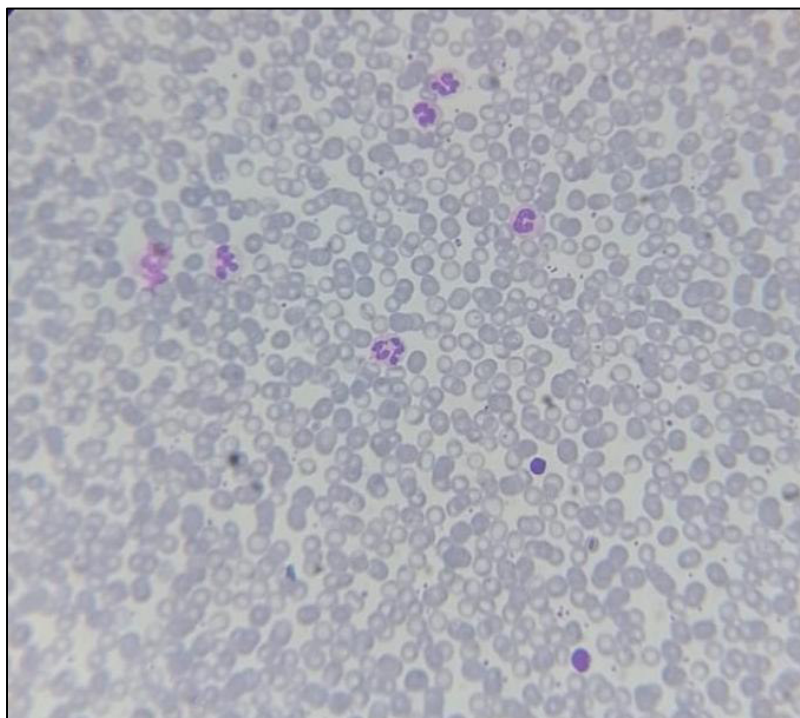
**Imagen A7:** Extendido de sangre periférica coloreado con MGG, se observa un linfocito, eritrocitos y plaquetas. 100X.



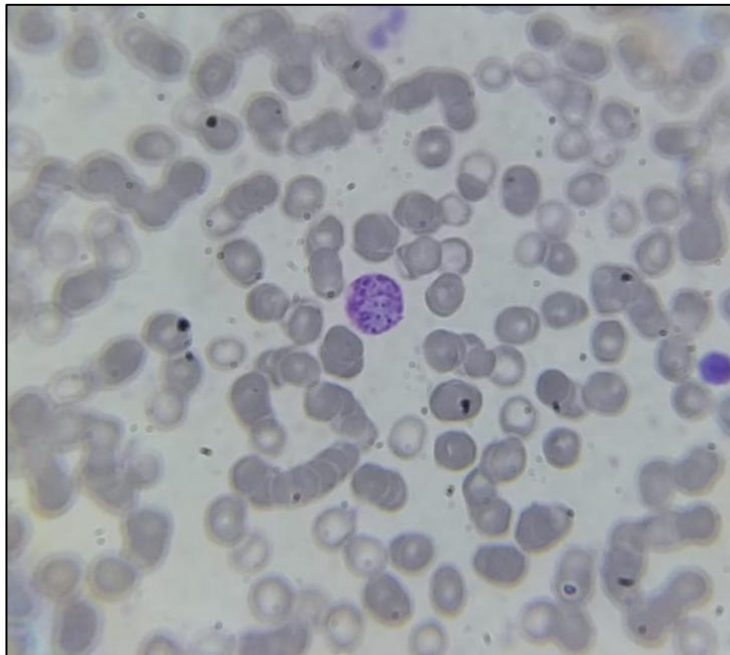
**Imagen A8:** Extendido de sangre periférica coloreado con MGG. Se observa un monocito vacuolado, eritrocitos con leve hipocromía y plaquetas. 100X.



**Imagen A9:** Extendido de sangre periférica coloreado con MGG. Se observan eritrocitos con marcada hipocromía y plaquetas. 100X



**Imagen A10:** Extendido de sangre periférica coloreado con MGG. Se observan neutrófilos polisegmentados y linfocitos. 40X.



**Imagen A11:** Extendido de sangre periférica coloreado con MGG. Se observa un basófilo central.100X.



**Imagen A12:** Extendido de sangre periférica coloreado con MG. Se observa un neutrófilo polisegmentado central, dianocitos y plaquetas. 100X.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read "J. Sandoval". The signature is written in a cursive style and is located in the bottom right corner of the page.