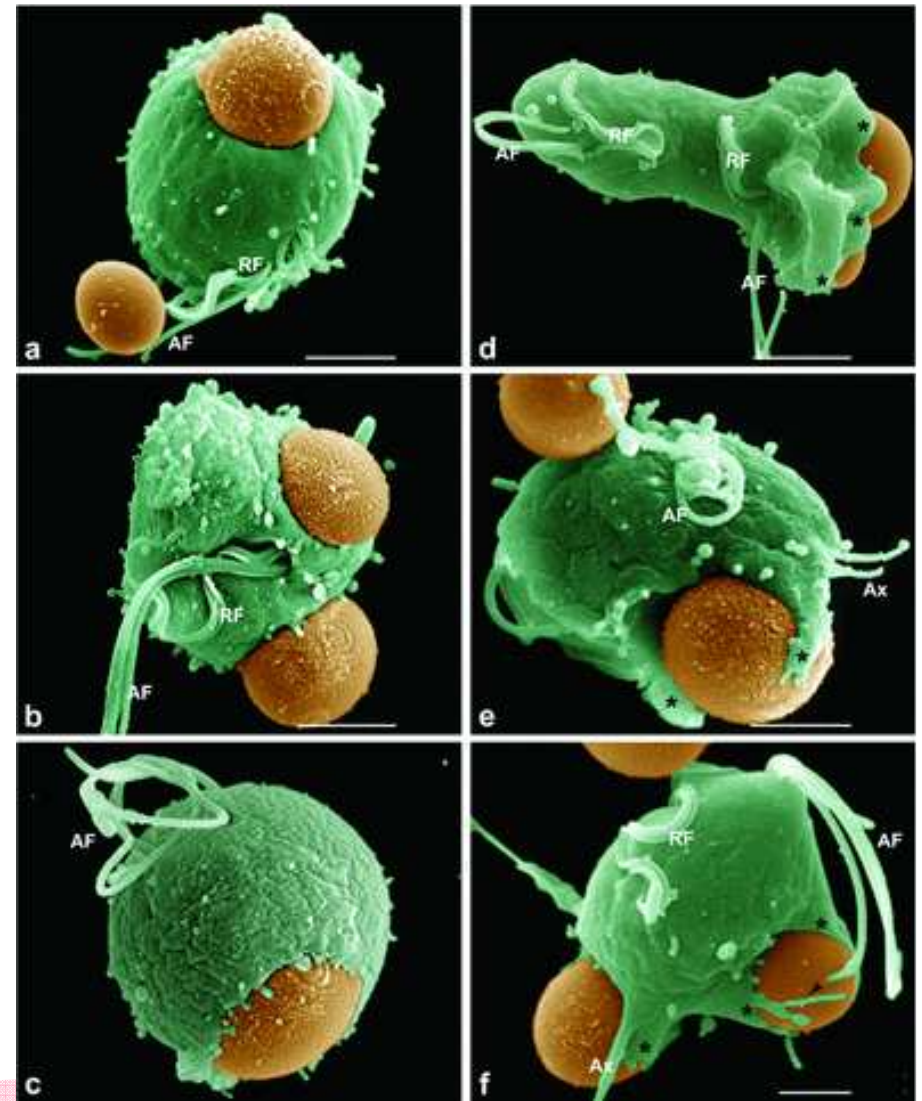
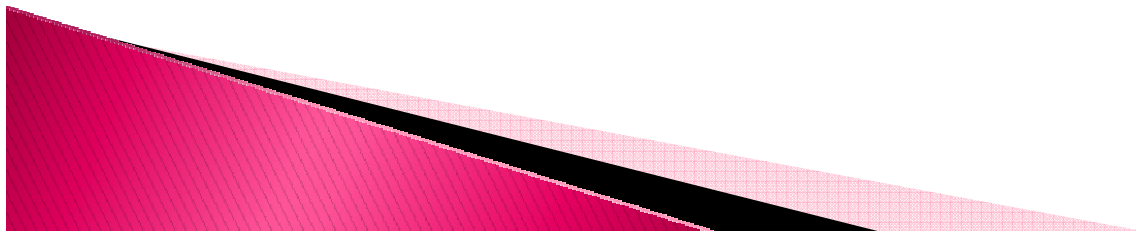


# Fagocitosis- Neutrófilos- Candida



- ▶ El proceso de fagocitosis comprende varios pasos secuenciales: quimiotaxis, adherencia de las partículas antigénicas a la superficie de los fagocitos, captación / ingestión (fagocitosis) y muerte intracelular mediada por mecanismos dependientes e independientes del oxígeno.



# Proceso de Fagocitosis

1. Quimiotaxis

2. Reconocimiento y Adhesión

Receptores endocíticos (RC, RFc ) y de señalización (TLR)


3. Captación e Ingestión (fagocitosis)

– degranulación

4. Muerte o Degradación

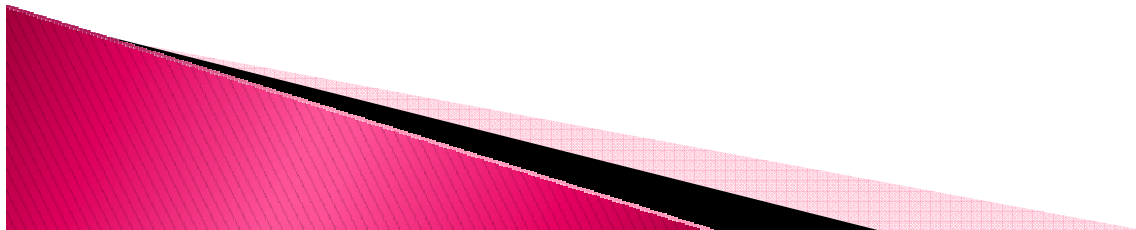
– O<sub>2</sub>-dependiente – *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOCl, NO*

– O<sub>2</sub>-independiente – *lisozima, proteínas catiónicas, defensinas, lactoferrina*

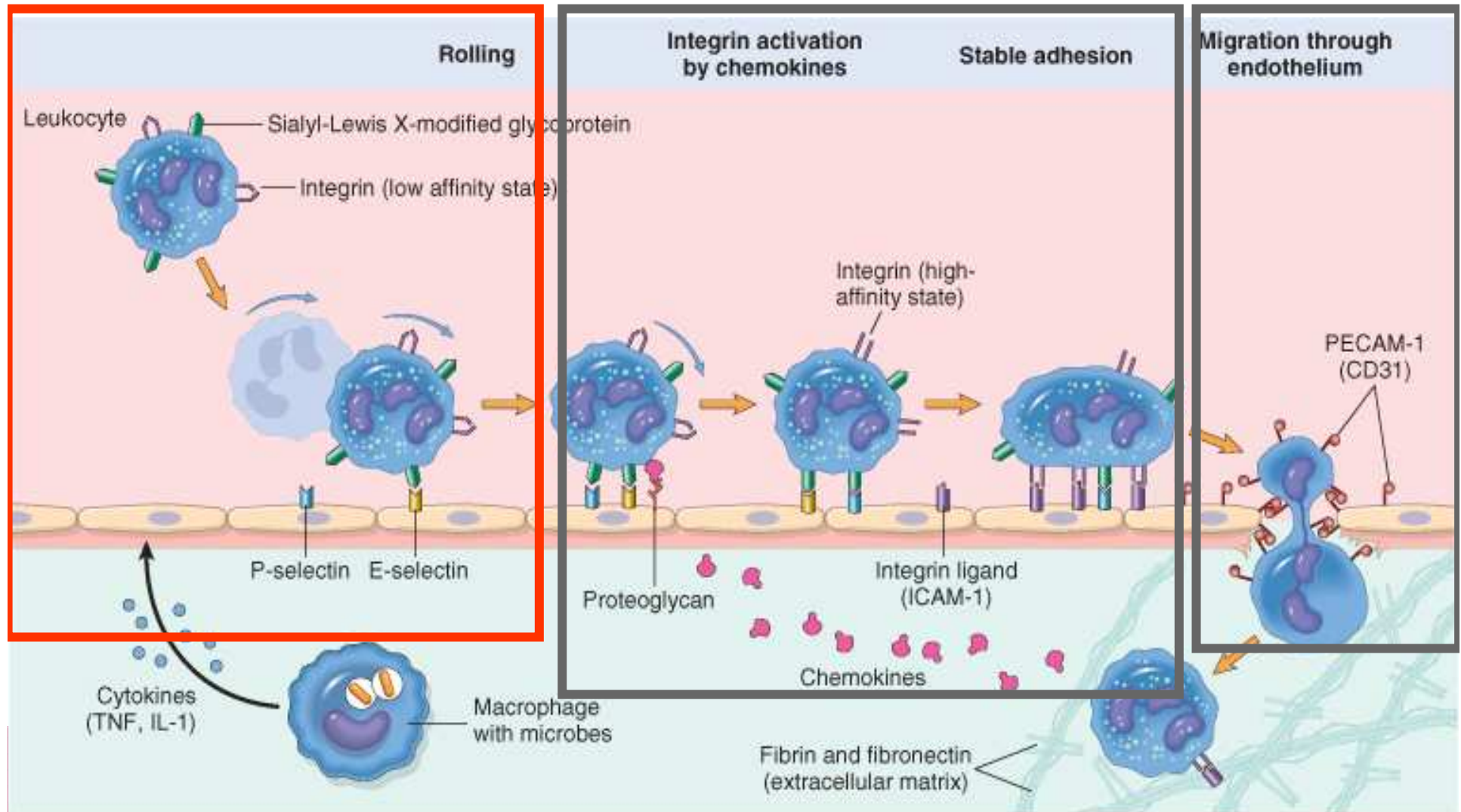


# 1-Quimiotaxis

- NT sensan y responden a gradientes de concentración de quimiotácticos ej: C5a, leukotrienos, Histamina, citoquinas, etc.

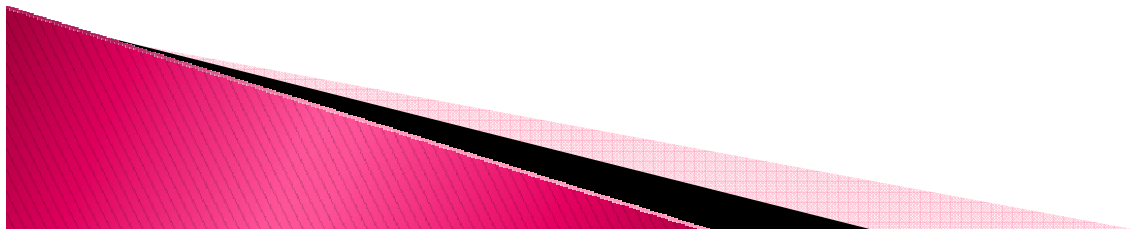


# 1-Chemotaxis

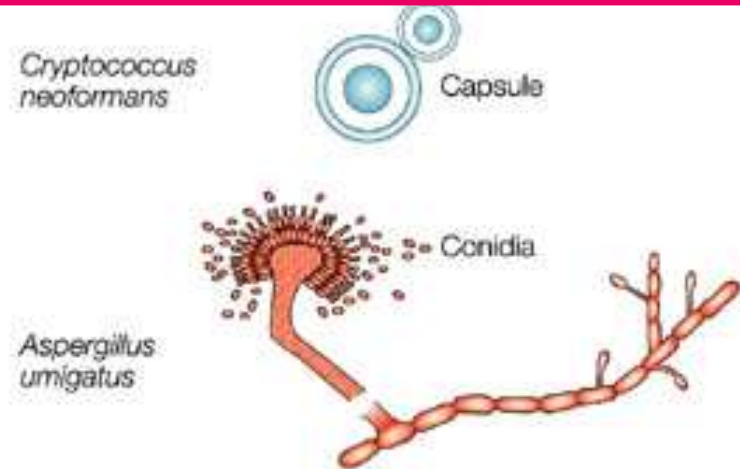
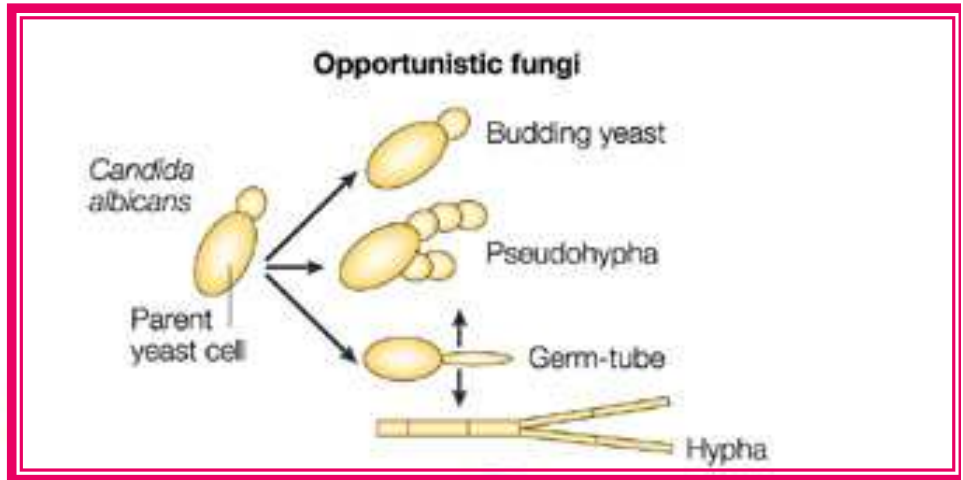
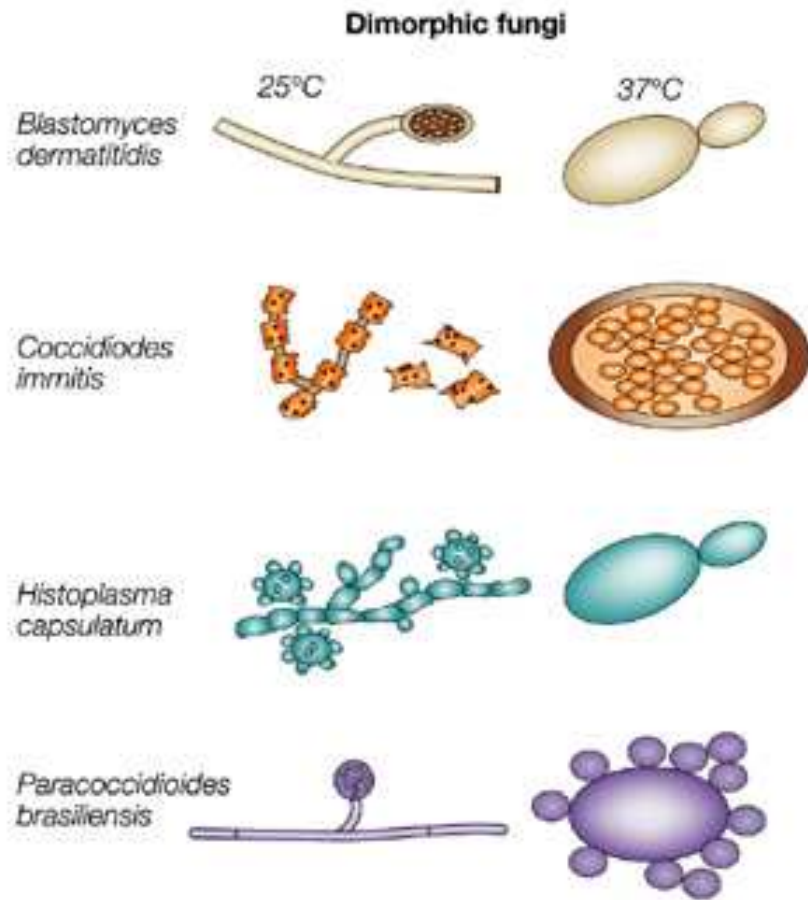


# La presencia de *Candida albicans* en determinados procesos infecciosos.

- Daño en la integridad de la piel por maceración de sus tejidos, heridas, abrasión por quemaduras térmicas o químicas y por presencia de catéteres vasculares.
- Alteración de la barrera mucocutánea por diabetes, uso de agentes antimicrobianos, irritación por incidencia de humo, uso de drogas citotóxicas, corticoides, entubaciones nasogástricas o diafragmas.
- Disminución del número de células fagocitarias como resultado de leucemia, granulomatosis, aplicación de radiaciones o quimioterapia contra el cáncer.
- Defectos intrínsecos en las funciones de las células fagocitarias como resultado de enfermedades granulomatosas crónicas y deficiencia de mieloperoxidasa.
- Alteración de la función fagocitaria causada por uremia, enfermedades virales y el uso de corticoides y agentes antimicrobianos como aminoglucósidos y sulfamidas.







# Pared de *Cándida Albicans*

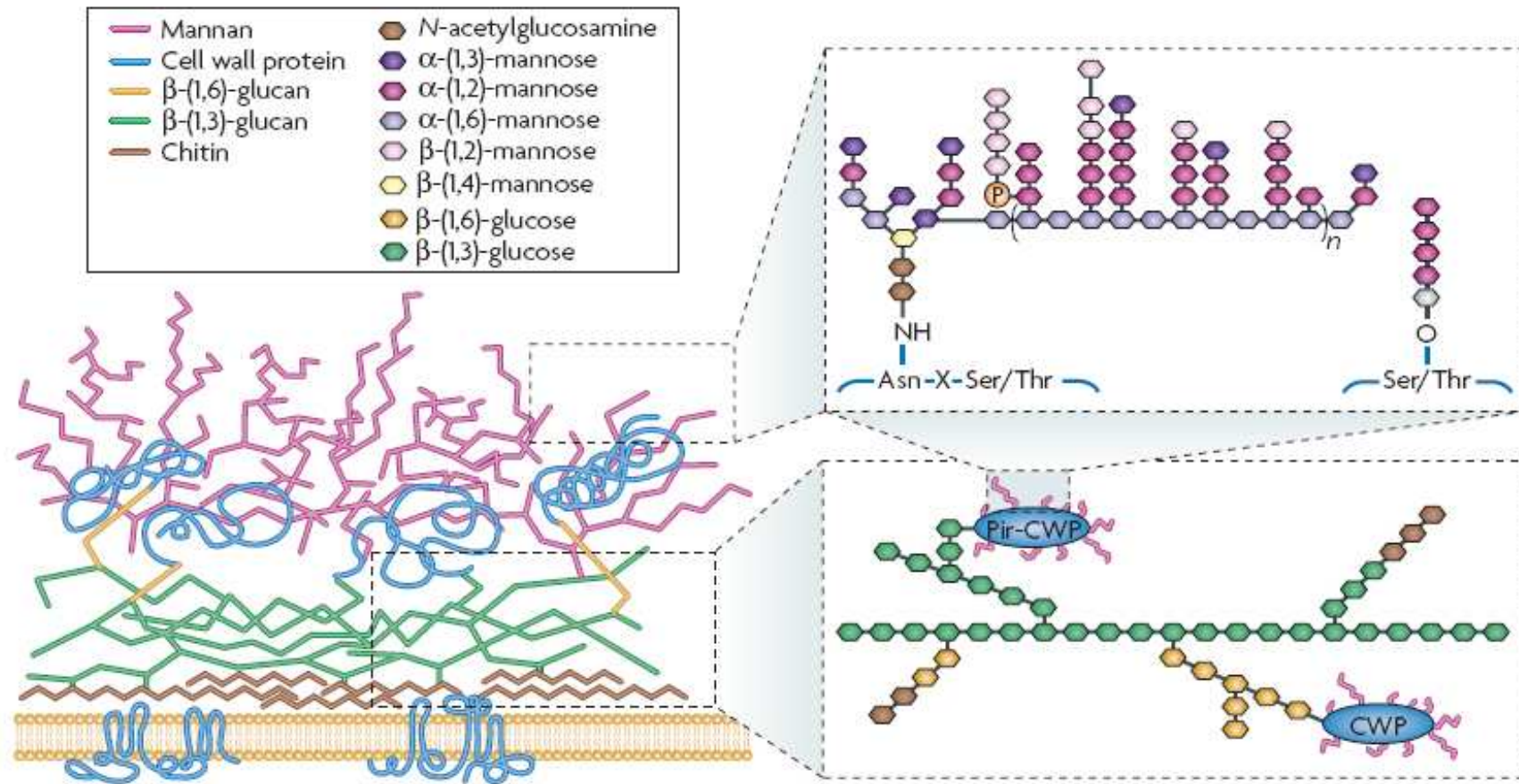


Figure 1 | **The structure of the *Candida albicans* cell wall.** The schematic shows the major components of the cell wall and their distributions.  $\beta$ -(1,3)-glucan and chitin (poly- $\beta$ -(1,4)-*N*-acetylglucosamine) are the main structural components, and these are located towards the inside of the cell wall. The outer layer is enriched with cell wall proteins (CWP) that are attached to this skeleton mainly via glycosylphosphatidylinositol remnants to  $\beta$ -(1,6)-glucan or, for mannoproteins with internal repeat domains (Pir-CWP), via alkali-sensitive linkages to  $\beta$ -(1,3)-glucan. The insets show the structure of the glucan and mannan components.



# 2-Reconocimiento y Adhesión

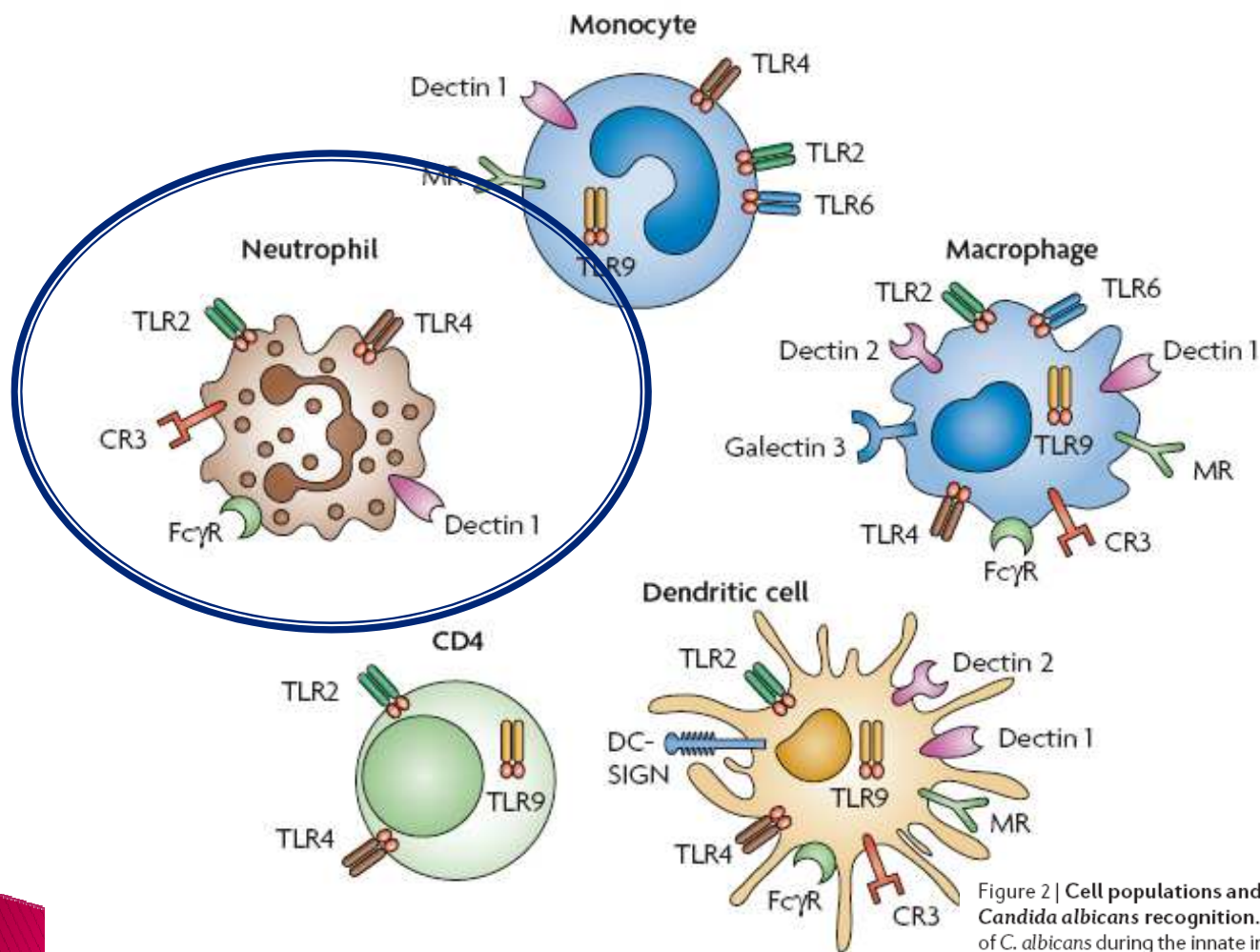
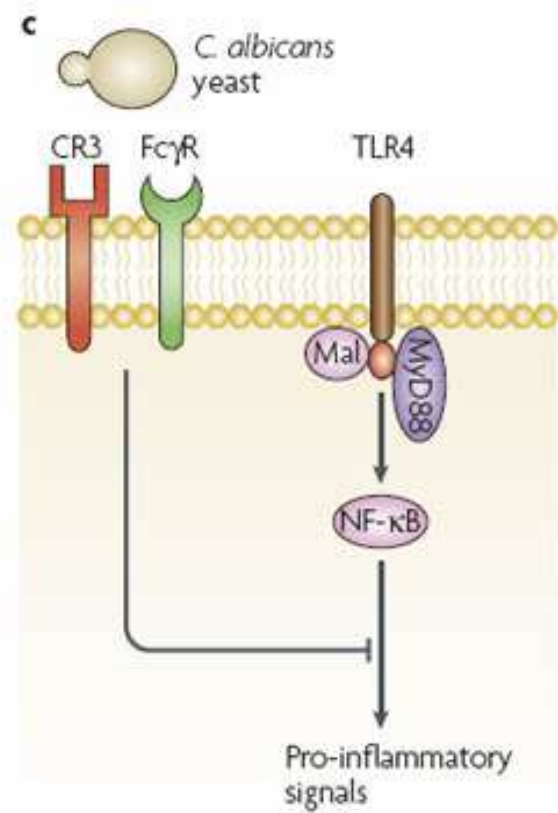
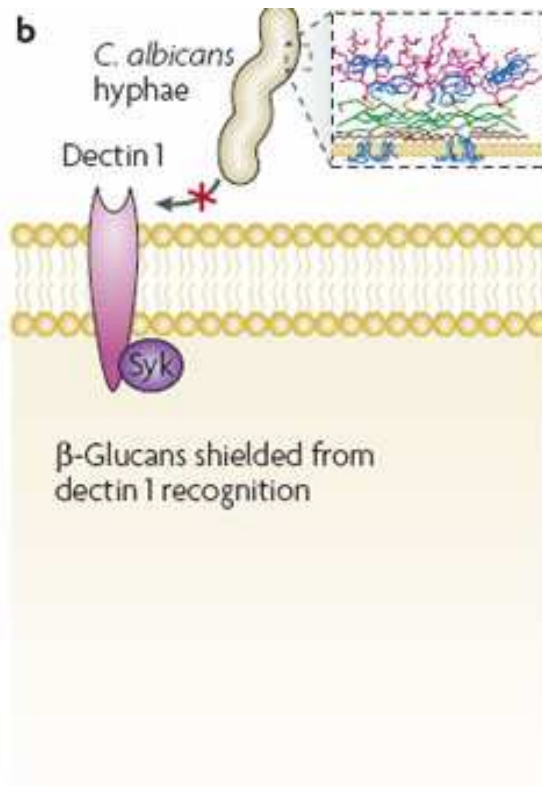
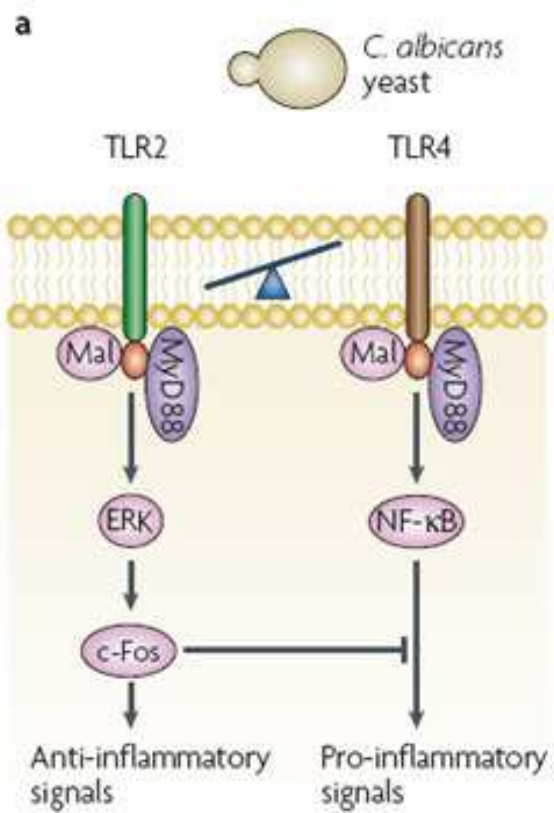
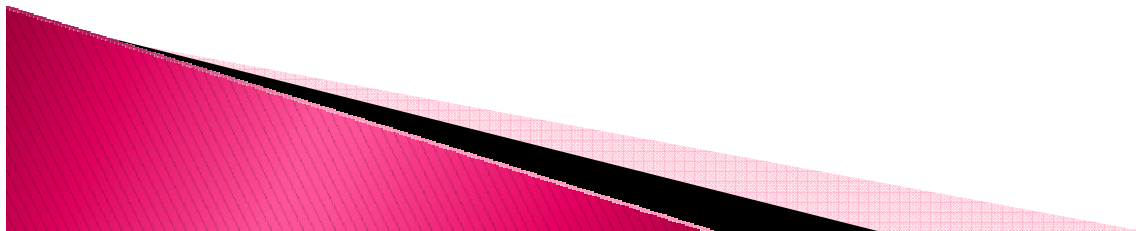


Figure 2 | Cell populations and pattern-recognition receptors involved in *Candida albicans* recognition. The main populations involved in the recognition of *C. albicans* during the innate immune response are the monocytes, neutrophils and macrophages. Dendritic cells are crucial for processing of, and antigen presentation to, T cells, and thus to activation of specific immunity. The differential expression of pattern-recognition receptors by these cell types is shown. CR3, complement receptor 3; FcγR, Fcγreceptor; MR, mannose receptor; TLR, Toll-like receptors.

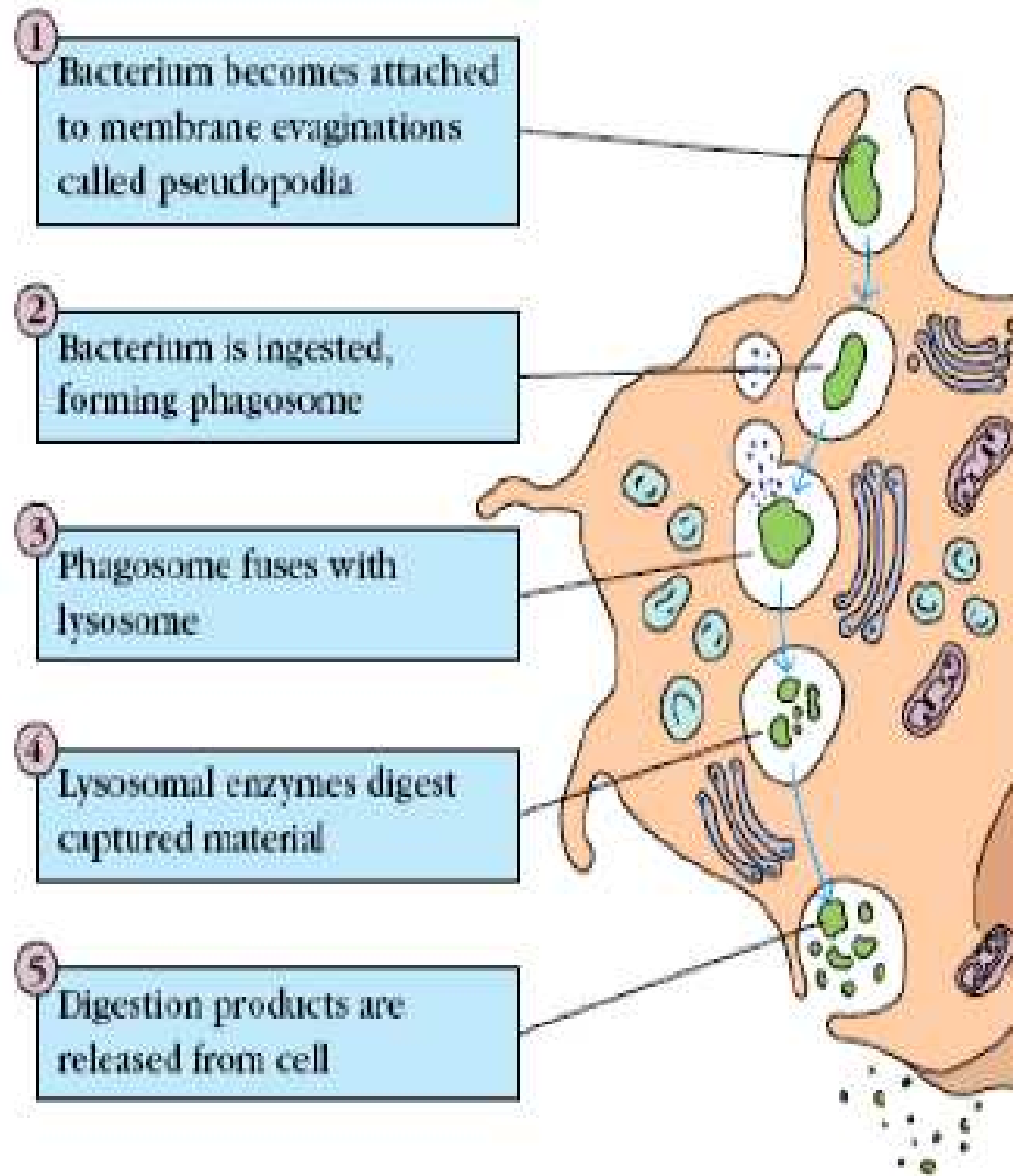


# Fagocitosis

- Los neutrófilos emiten pseudópodos, en el interior de la célula se forma *fagosoma*.
- *Fagosoma se fusiona con el lisosoma.*
- *Fagolisosoma: compartimiento ácido con elevada conc de hidrolasas y proteasas.*
- *Digestión del material fagocitado por las enzimas activadas .*

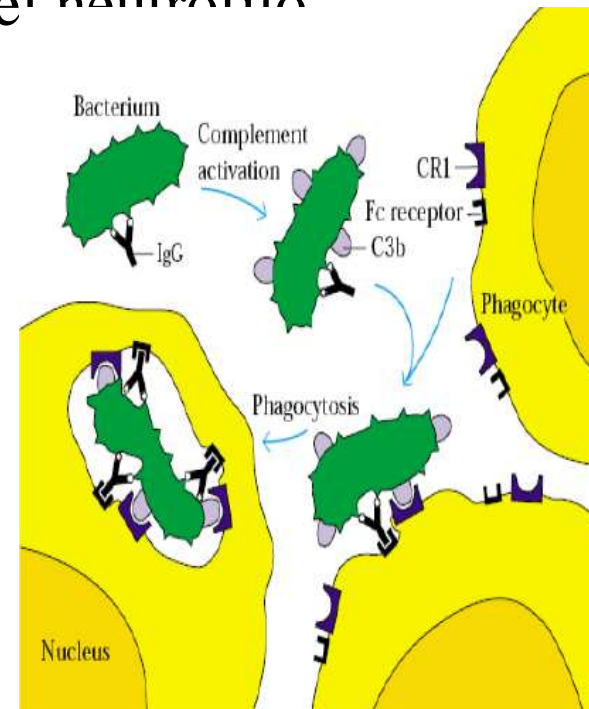


# 3-Fagocytosis



# Opsonización


- ▶ Partículas *opsonizadas* son fagocitadas más eficientemente
- ▶ C3b y C4b son las principales opsoninas.
- ▶ Inmunocomplejos y antígenos recubiertos por opsoninas se unen a se receptores CR3 ,FcR de<sup>1</sup> neutrófilo





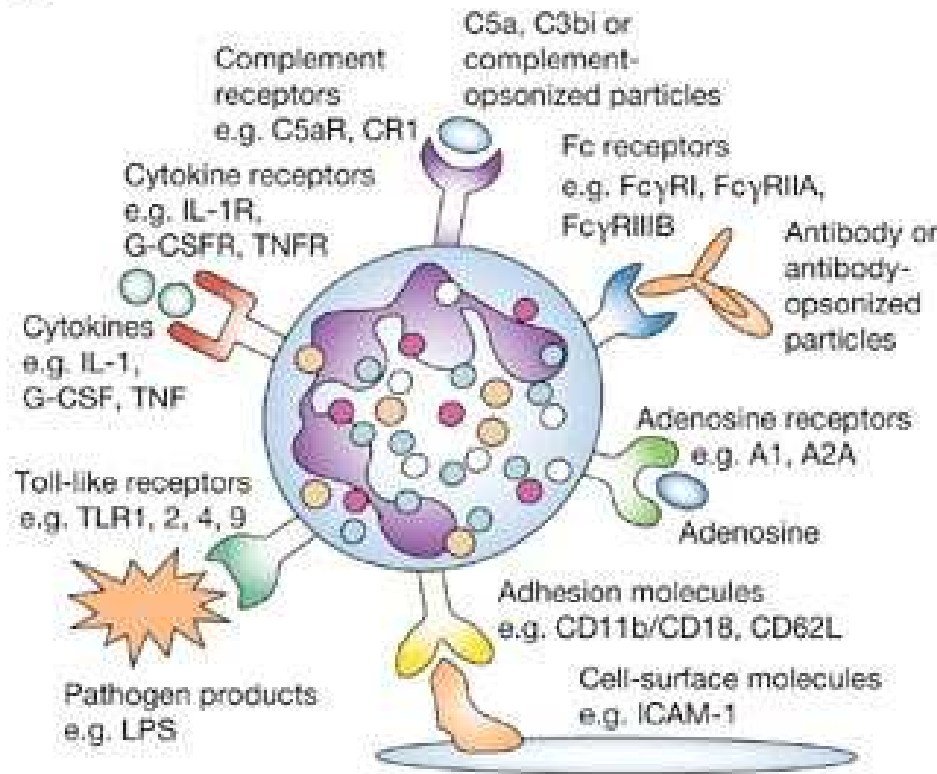
# 3-Captación e Ingestión

## ▶ DEGRANULACIÓN

- Gránulos primarios o azurofilos: Lisozima, Mielopéroxidasa , elastasa , defensinas ,etc
  - Gránulos secundarios o específicos: Lactoferrina, Gelatinasa , colagenasa, lisozima,etc
  - Deficiencia en degranulación: *Chediak-Higashi*, con albinismo parcial, infecciones recurrentes, bacterianas y micóticas . Gránulos anormalmente grandes en neutrófilos y también en melanocitos, neuronas, fibroblastos, etc.Los sitios de infección mas afectados son piel y sistema respiratorio superior e inferior.
- 

# Gránulos de los Neutrófilos

A



B

## Azurophil granules

Myeloperoxidase  
Neutral serine proteases  
cathepsin G  
elastase  
proteinase 3  
Bacterial/permeability-  
increasing protein  
Defensins  
Lysozyme

## Specific granules

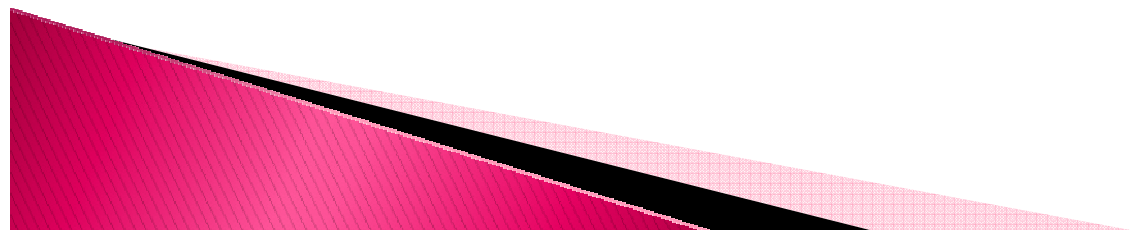
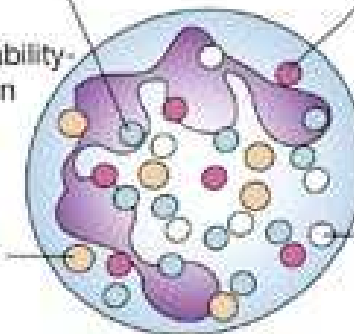
Lactoferrin  
Lysozyme  
Cytochrome b558  
Collagenase  
Gelatinase  
CD11b/CD18  
fMLP-R

## Gelatinase granules

CD11b/CD18  
Cytochrome b558  
Gelatinase  
Lysozyme  
Acetyltransferase

## Secretory vesicles

CD11b/CD18  
Cytochrome b558  
CR1  
Alkaline phosphatase  
fMLP-R



## Mecanismos dependientes de oxígeno

### - Estallido respiratorio

- ▶ NADPH oxidasa : anión superóxido

- ▶ IROS:

- 1) radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>)
- 2) oxígeno singlete (O.)
- 3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- ▶ INOS

### - Mecanismos Oxidativos

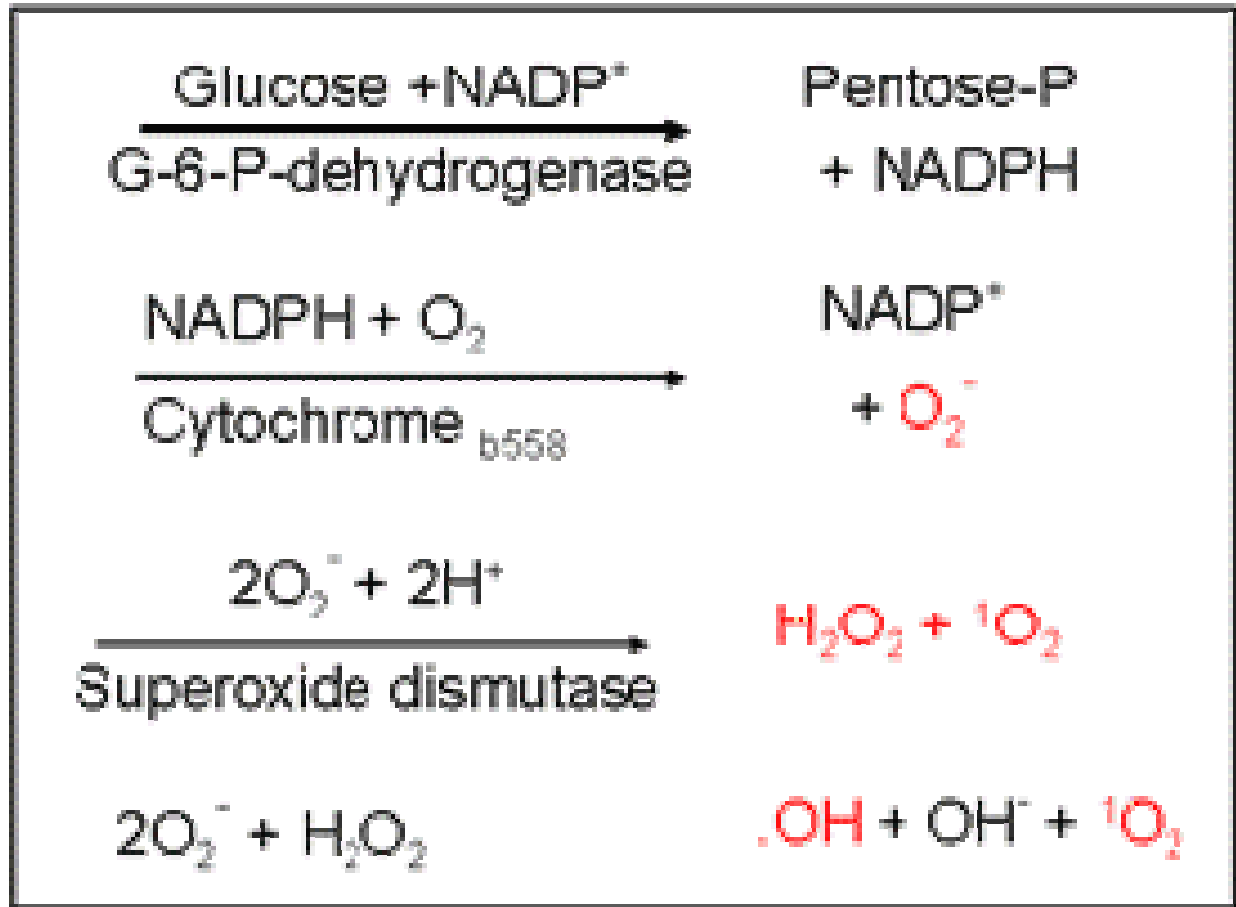
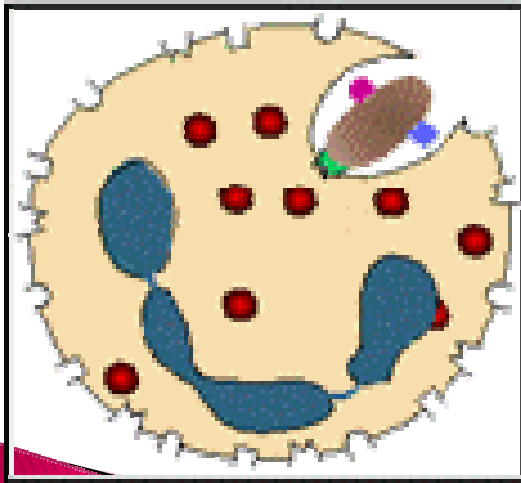
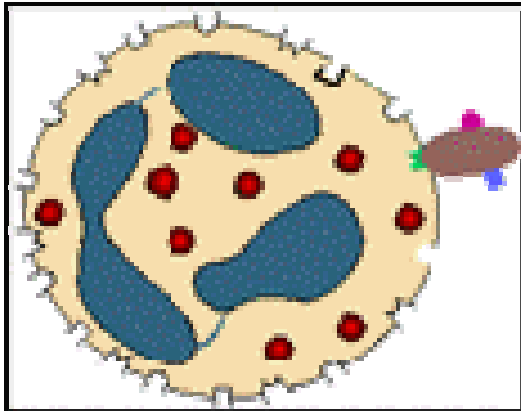
- ▶ MPO dependientes: OCl<sup>-</sup> : oxida moléculas- potencia la lisis.

## Mecanismos independientes de oxígeno

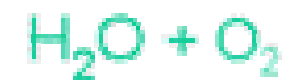
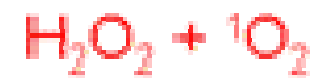
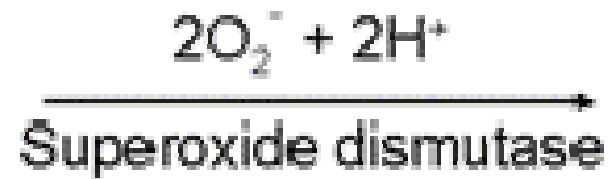
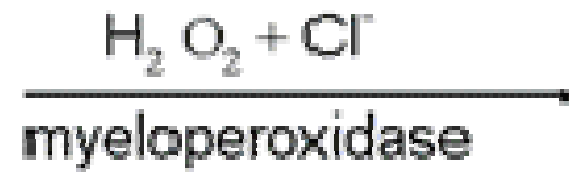
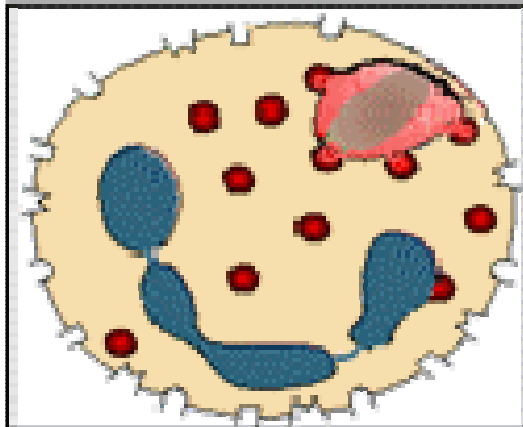
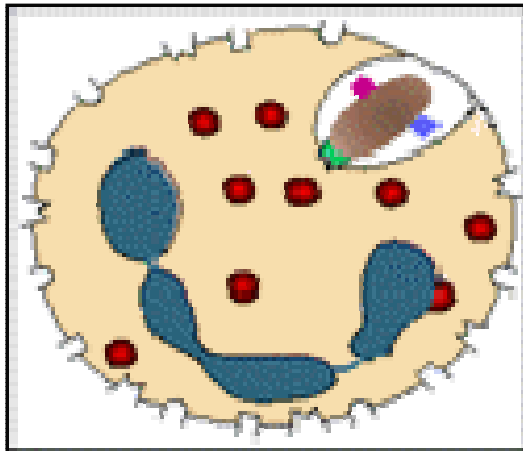
- ▶ a) acidificación fagosoma: potencia acción catalasas
- ▶ b) proteínas catiónicas , *lisozima* , *defensinas* , *lactoferrina*

- Deficiencia de NADPH oxidasa → *Enfermedad Granulomatosa crónica*, con infecciones recurrentes bacterianas y micóticas.

# Estallido respiratorio

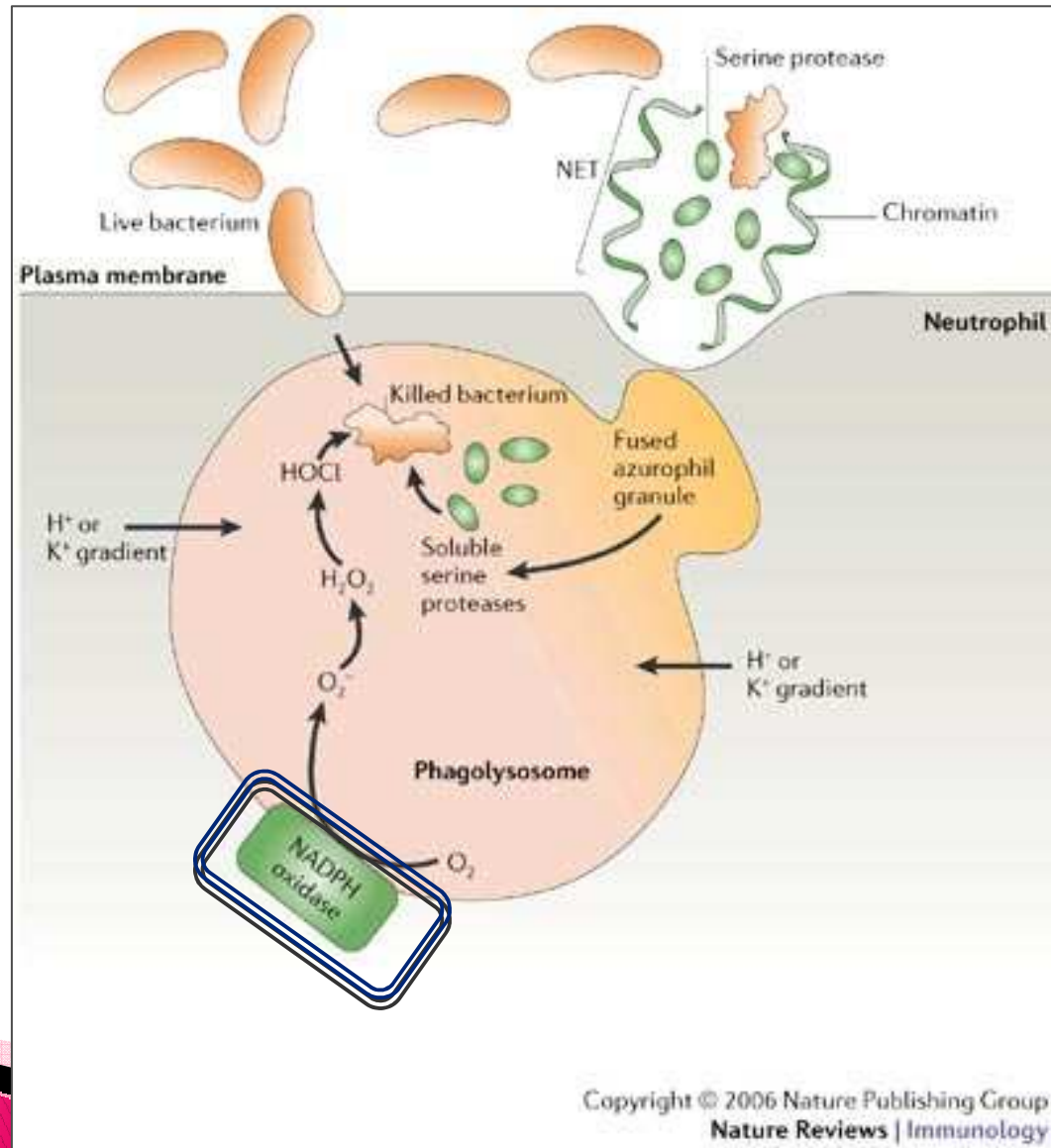


# MPO

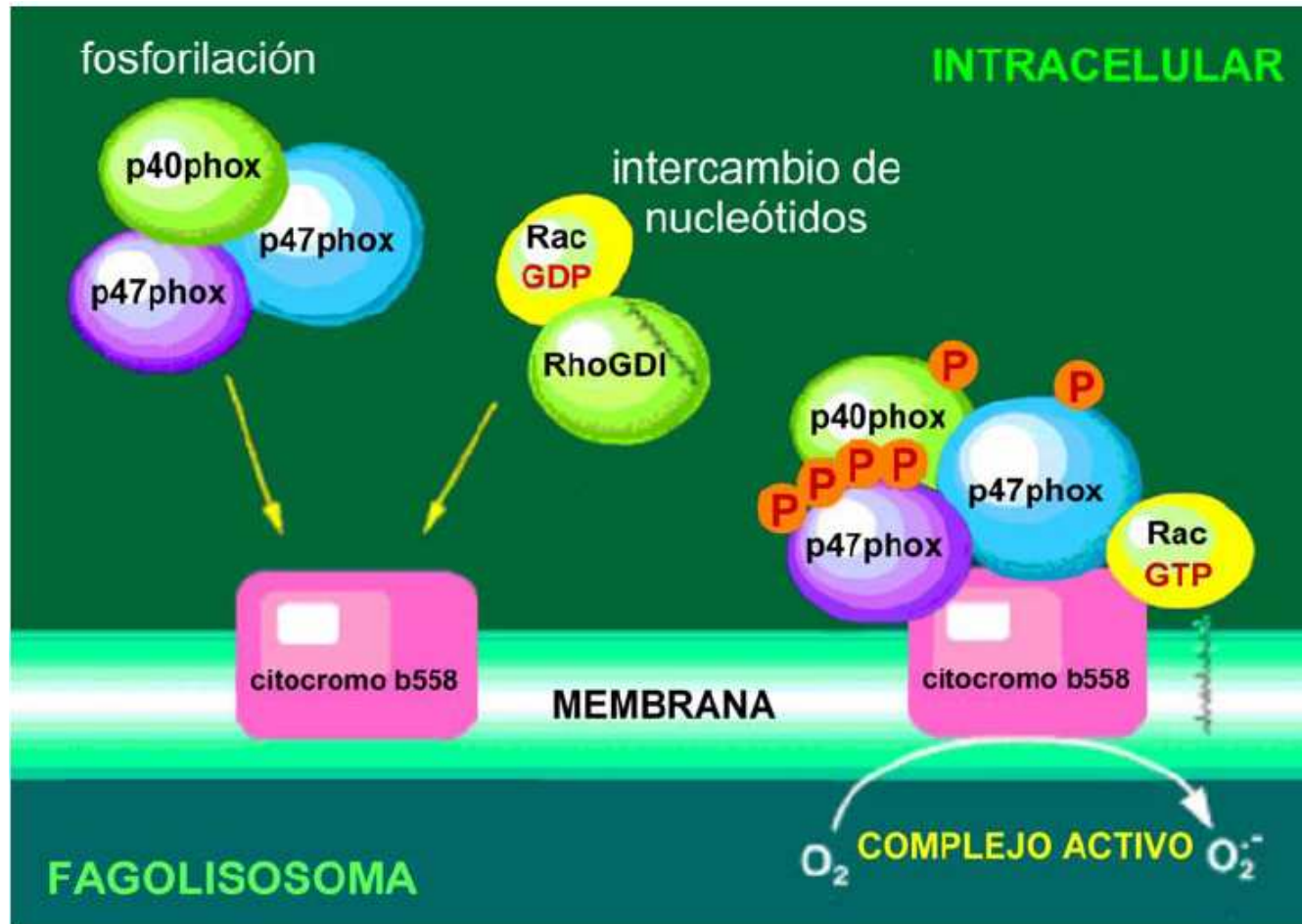




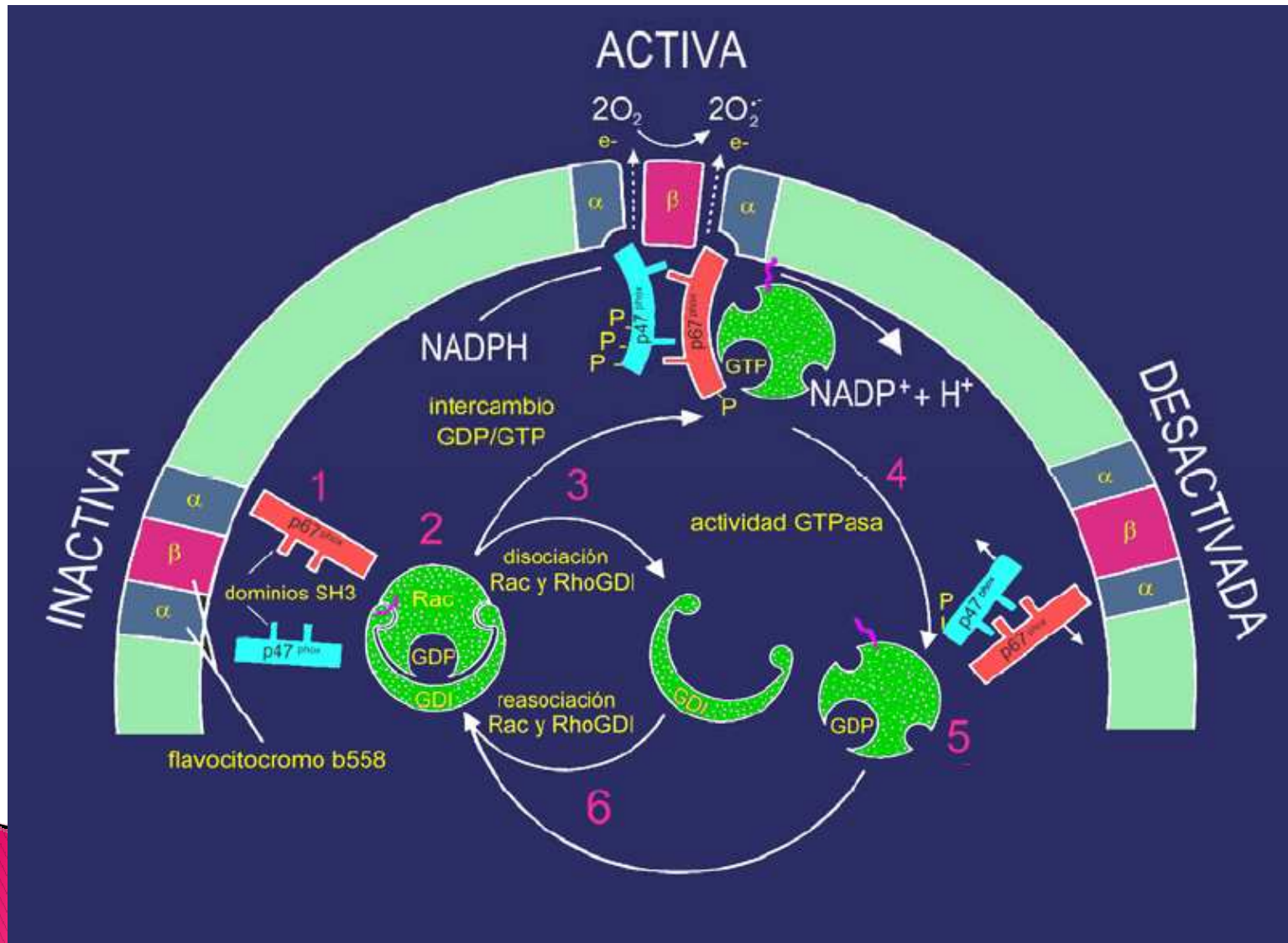
# Complejo NADPH - Oxidasa



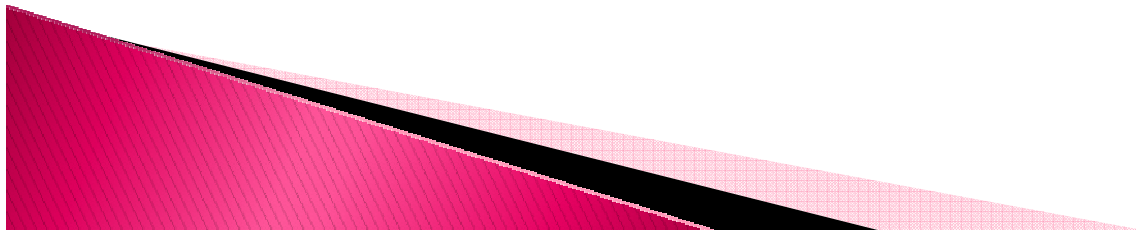
# Complejo NADPH oxidasa



# Complejo NADPH oxidasa



# Opsonofagocitosis y lisis de *Candida albicans* por PMNs



## Separación de los PMNs

- ▶ La sangre periférica se obtiene por punción venosa y se colocan aproximadamente 2 ml sobre portaobjetos esmaltados.
- ▶ Se incuba a 37° C durante dos horas en cámara húmeda.
- ▶ Se elimina el coágulo lavando el portaobjeto con buffer PBS tibio.

## Preparación de la *Cándida albicans*:

- ▶ La *Cándida* se siembra en medio Sabouraud en pico de flauta y se cosecha ocho horas después de sembrada, asegurando una viabilidad del 100%. Las *cándidas* se lavan con buffer PBS para eliminar residuos, centrifugando diez minutos a 400g. Se resuspenden en PBS agitando en Vortex para obtener microorganismos aislados en una suspensión homogénea y se ajusta a la concentración de  $5 \times 10^6$  *cándidas*/ml en PBS.

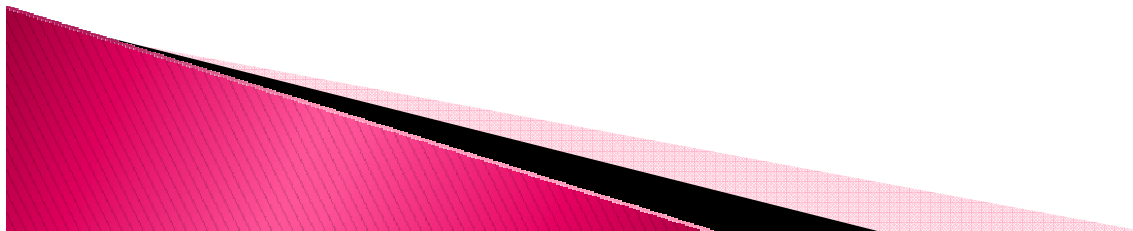


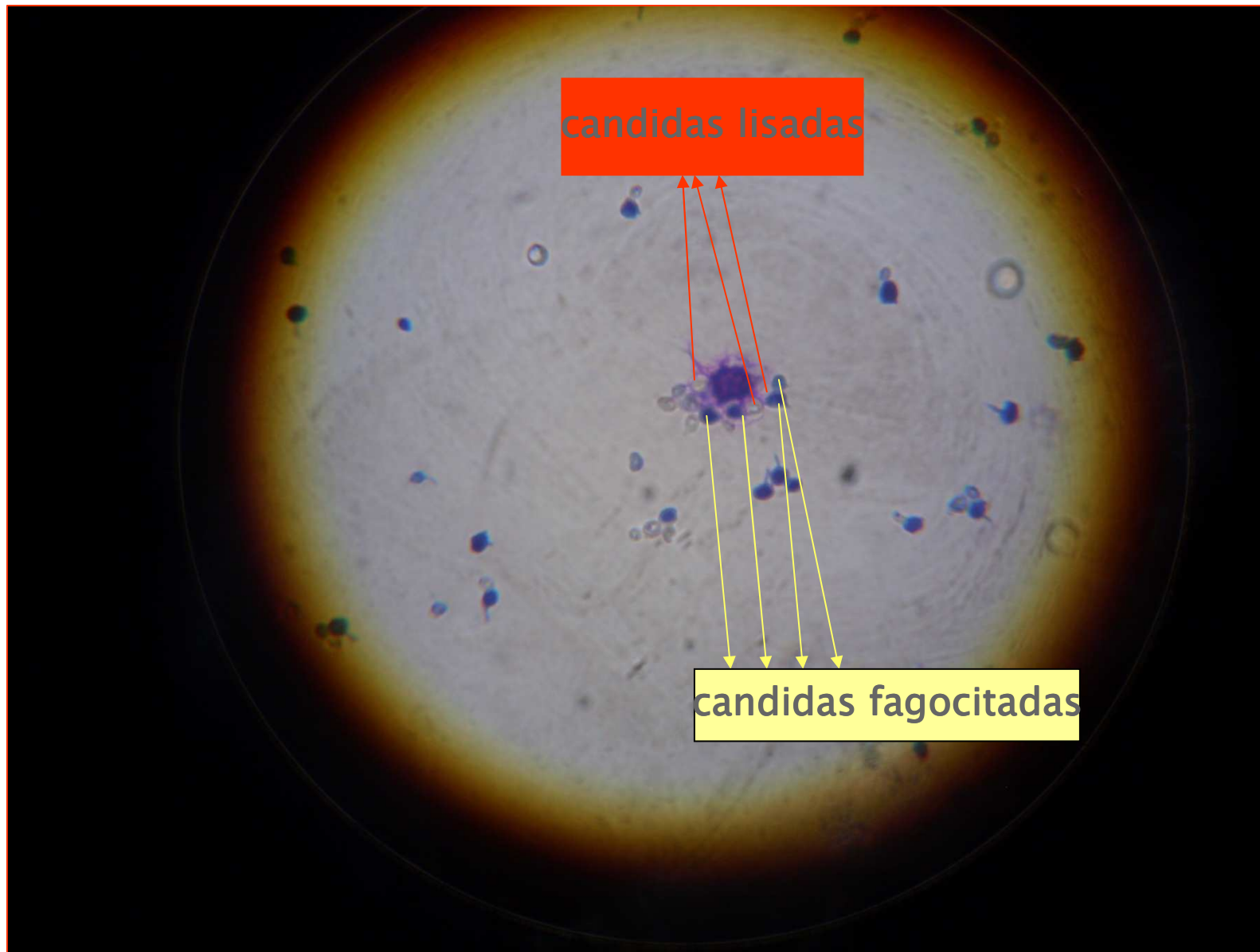
## ▶ Procedimiento:

- ▶ Sobre los portaobjetos a los cuales se han adherido los PMNs, colocar 1 ml de la suspensión de cándidas preparadas en distintas condiciones (sin opsonizar y opsonizadas con los distintos sueros). Incubar con las células durante 30 minutos a 37° C en cámara húmeda. Al finalizar el periodo de incubación, las levaduras no fagocitadas se eliminan por lavado con PBS tibio (37° C). Los preparados se dejan secar al aire, se colorean con Giemsa diluido (1/10), durante 10-15' y se observan al microscopio.
- ▶ La actividad fagocítica se expresa como el número de cándidas ingeridas por 100 PMNs. La actividad lítica se expresa como el porcentaje de cándidas fagocitadas que están muertas (imágenes fantasmas no teñidas por el Giemsa).

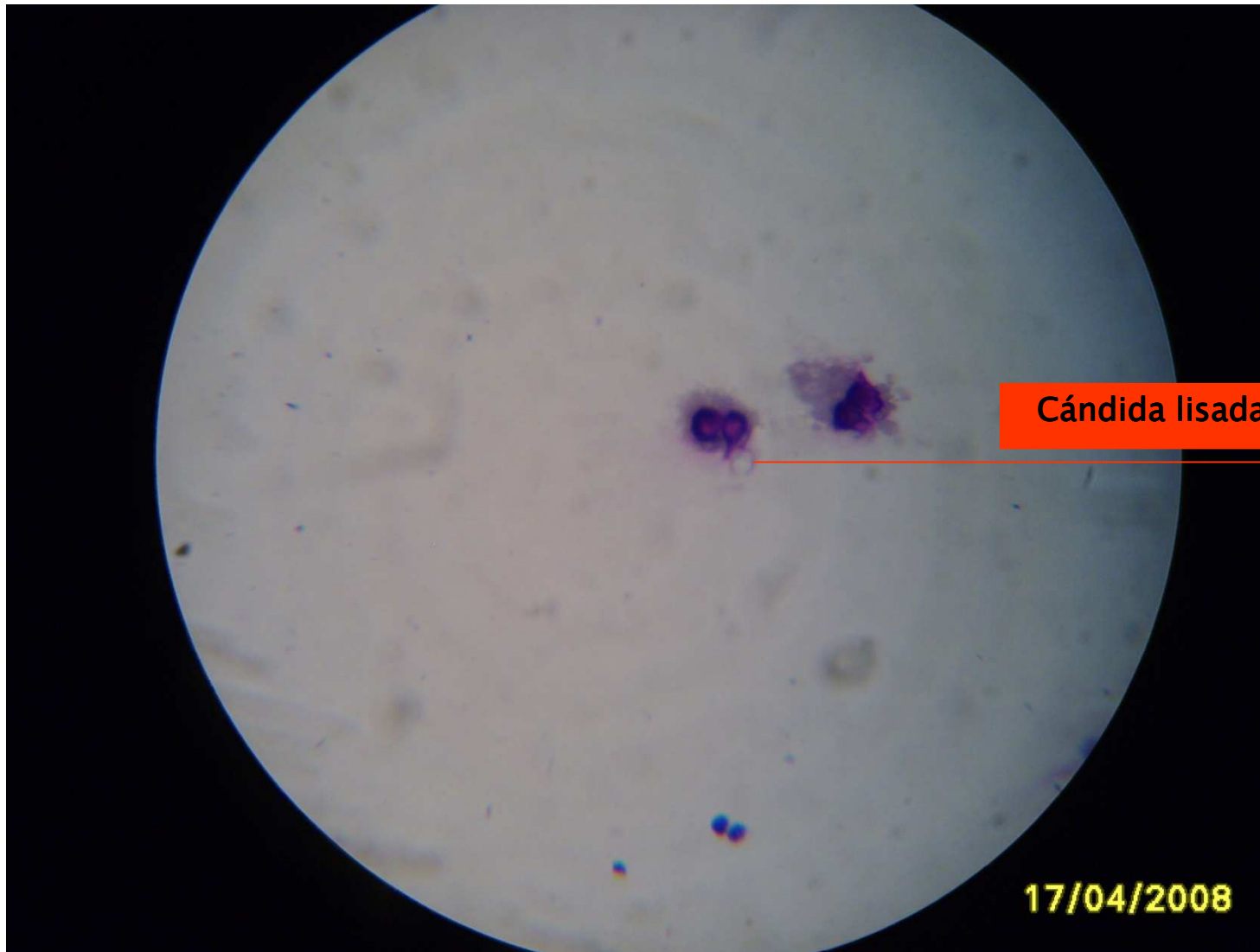
## **Expresión de los resultados:**

- ▶ En sangre periférica de adultos jóvenes y sanos, el rango de actividad fagocítica de PMNS es de 300-400 cándidas fagocitadas /100 PMNs. En cuanto a la actividad lítica del PMN, ésta es en sujetos normales de 12-17% para la C albicans.





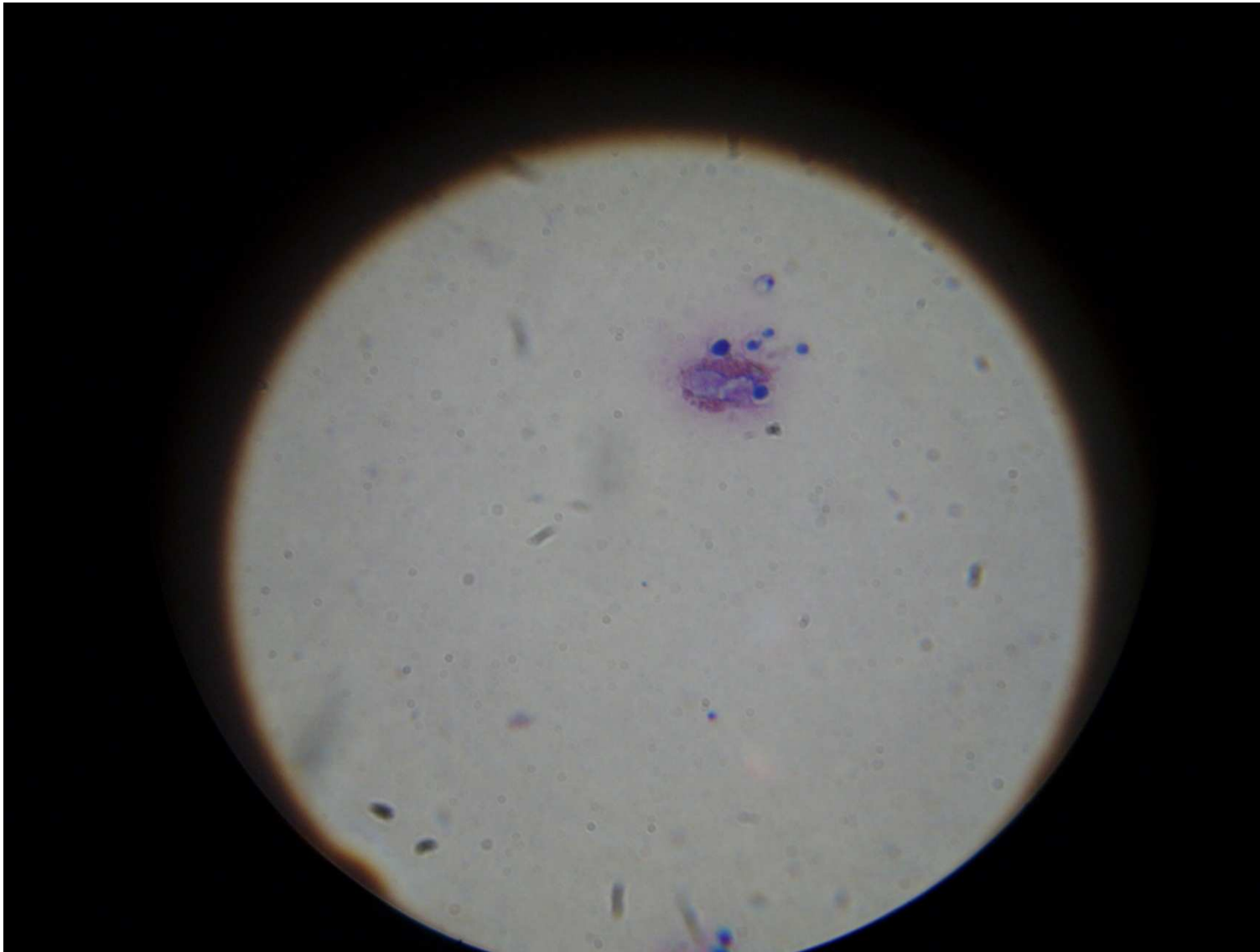
Se observa un neutrófilo con 4 cándidas fagocitadas y 3 cándidas lisadas (fantasmas) en campo de 100X



Cándida lisada

17/04/2008

Se observa un neutrófilo con una candida en su interior lisada. 100X



En esta imagen se puede observar un eosinófilo que ha fagocitado 5 cándidas y 1 cándida lisada.100X

Fin

