

Aislamiento de organelos en macrófagos humanos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*

Karen Bobadilla,* Fernando Hernández-Sánchez,* Yolanda González-Hernández,*
Martha Torres-Rojas* ✉

Departamento de Investigación en Microbiología. Unidad de Investigación. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas.*
Trabajo recibido; 30-IX-2010; aceptado: 10-II-2011

RESUMEN. Antecedentes: Desde hace más de 40 años, tanto la centrifugación diferencial como la centrifugación por gradiente de densidad son utilizadas para el aislamiento de organelos subcelulares. Sin embargo, en estas técnicas no siempre se conservan las propiedades biológicas de los organelos, por lo tanto, es necesario realizar modificaciones técnicas que permitan aislar organelos conservando sus propiedades biológicas. **Metodología:** Se obtuvieron monocitos derivados a macrófagos a partir de 180 mL de sangre periférica de voluntarios sanos. Los macrófagos se infectaron con *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), homogenizaron mecánicamente y ultracentrifugaron utilizando un gradiente de Percoll al 27%. Posteriormente, el homogenizado se fraccionó manualmente de acuerdo con su densidad en 30 fracciones. **Resultados:** Los organelos fueron separados de acuerdo con su densidad. La membrana plasmática con una densidad de 1.040 g/mL se localizó en las fracciones 10-14. Los fagosomas y fagolisosomas con una densidad de 1.109 g/mL se localizaron en las fracciones 22-29. La caracterización de los organelos subcelulares fue realizada mediante métodos fluorométricos específicos por la identificación de acoplamiento de biotina (membrana plasmática), identificación de fracciones conteniendo *M. tuberculosis* y de la enzima fagolisosomal β -hexosaminidasa. **Conclusiones:** La técnica de ultracentrifugación en combinación con técnicas enzimáticas es útil para aislar y caracterizar fagosomas, fagolisosomas y membrana plasmática. Estos organelos están involucrados en el procesamiento y presentación de antígenos, su aislamiento es crucial para el estudio de su papel en la respuesta inmune.

Palabras clave: Organelos, fraccionamiento subcelular, ultracentrifugación, gradiente de Percoll.

ABSTRACT. Background: For over 40 years the differential centrifugation and centrifugation by density gradient have been used for the isolation of subcellular organelles. However, these techniques do not always are preserved the biological properties of the organelles therefore is necessary to make technical changes to isolate organelles conserving its biological properties.

Methodology: We obtained derived monocytes to macrophages from 180 mL peripheral blood of healthy volunteers. Macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*, homogenization mechanically and centrifuge using Percoll gradient to 27%. Subsequently, the homogenized was fractioned manually according to their density in 30 fractions.

Results: The organelles were separated according to their density. The plasma membrane with a density of 1,040 g/mL was localized in 10-14 fractions. Phagosomes and phagolysosomes with a density of 1,109 g/mL were found in 22-29 fractions. Characterization of subcellular organelles was performed by fluorometric methods for identifying specific, biotin coupling (plasma membrane), fractions containing the identification of *Mycobacterium tuberculosis* and fagolisosomal enzyme β -hexosaminidase.

Conclusions: The technique of ultracentrifugation in combination with enzymatic techniques useful to isolate and characterize phagosomes, phagolysosomes and plasma membrane. These organelles are involved in the processing and presentation of antigens and their isolation is crucial to study its role in the immune response.

Key words: Organelles, subcellular fractionation, ultracentrifugation, gradient of Percoll.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de técnicas de fraccionamiento celular son un medio para lograr el análisis de la composición y propiedades de elementos celulares purificados. El fraccionamiento subcelular es esencial para el desarrollo de ensayos "libres de células". Estos ensayos han provisto de nuevas e importantes herramientas para entender los mecanismos moleculares de las diversas

funciones celulares. La microscopía electrónica y confocal determinan la disposición de los organelos y de los grandes agregados macromoleculares en las células y tejidos; sin embargo, muchos estudios bioquímicos e inmunológicos requieren del aislamiento de organelos subcelulares. La obtención de estas estructuras aisladas tiene por objeto, fundamentalmente, el estudio de diversas funciones como p. ej., la respiración celular, las vías metabólicas de distintas fracciones como la

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/neumologia>

microsomal, conocimiento de la estructura y función de diversos tipos celulares como los eosinófilos,¹ incluyendo la composición y función de sus gránulos, así como los estudios en los neutrófilos en donde se han reportado la heterogeneidad, composición y movilidad de sus gránulos utilizando gradientes de densidad.²

Existen dos métodos de fraccionamiento celular, el primero es la centrifugación diferencial; y el segundo, la centrifugación por gradiente de densidad. La centrifugación diferencial es uno de los métodos más ampliamente empleados, y es usado en los primeros pasos en el fraccionamiento celular, ya que puede separar rápidamente organelos grandes de los más pequeños, empero, tiene la desventaja de que la separación pueda ser incompleta. La selección de la velocidad y del tiempo de centrifugado dependerá del tamaño, peso, densidad y forma de los organelos de estudio. Este método es capaz de separar diferentes fracciones, como la nuclear, mitocondrial, microsomal y citosólica. La centrifugación por gradiente de densidad tiene la capacidad de combinar la velocidad de sedimentación más un gradiente de densidad como la sacarosa. Este método es empleado cuando se necesita de un aislamiento de organelos subcelulares con una mejor pureza. La centrifugación por gradiente de densidad puede ser continua y discontinua. Los primeros se caracterizan por sedimentación a través de un gradiente de densidad con altas concentraciones de carbohidratos o sales de metales pesados. Existen dos tipos de gradientes continuos, los preformados y los formados *in situ*. Estos tipos de gradientes son útiles para purificar ácidos nucleicos como DNA, RNA y microsomas. Los gradientes discontinuos se logran con la utilización de azúcares como la sacarosa, la cual es usada frecuentemente para la separación de organelos y virus; otros, son los polisacáridos como el ficoll, gradientes usados para aislar, tanto células como organelos y virus con la misma calidad, y la sílica coloidal como el Percoll. Este reactivo está compuesto por partículas cubiertas de sílica polivinilpirrolidona de 20 nm, el rango del gradiente va de 1.0-1.3 g/mL y esto va a depender del tiempo y la velocidad del centrifugado, así como con qué se disuelva (puede ser con agua o con sacarosa), este compuesto es ampliamente usado con éxito para aislar células y organelos. El Percoll, por sí mismo, tiene un efecto estabilizador en las membranas de los organelos, lo que mantiene su actividad enzimática.³

Para la purificación de organelos subcelulares se ha usado la combinación de la centrifugación diferencial con un doble gradiente de densidad. Por este método se han aislado endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas con el objeto de analizar el papel de estos organelos en la degradación del material que fue endositado.⁴ También fueron aisladas membranas de le-

vaduras para conocer la composición de sus lípidos.⁵ De igual forma, fueron aislados autofagosomas utilizando un doble gradiente de densidad, lo que les permitió caracterizar la composición de proteínas y marcadores de maduración en autofagosomas de hepatocitos de rata.^{6,7}

En nuestro grupo nos hemos enfocado al estudio del fagosoma como sitio de formación de los complejos péptidos micobacterianos-MHC clase II.⁸ Los primeros antecedentes fueron reportados en la década de los noventa donde separaron compartimentos subcelulares con el objeto de buscar formas funcionales de moléculas de clase II utilizando gradientes de densidad.^{9,10} En esta investigación usamos la técnica de ultracentrifugación utilizando un gradiente de Percoll al 27% para la purificación de fracciones subcelulares, como fagosomas, fagolisosomas, y membrana plasmática de macrófagos humanos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Bacteria. *M. tuberculosis* cepa H37Ra, obtenida de la ATCC#TB127. *M. tuberculosis* creció en medio Mildrebrok 7H9 durante 21 días, se congeló y guardó en alícuotas hasta su momento de uso. Las unidades formadoras de colonias fueron determinadas en placas de agar 7H10 a 37°C, 5% CO₂ por 21 días de incubación.

Tinción de *M. tuberculosis* con FLUOS. La micobacteria fue teñida con FLUOS (5(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide éster). La tinción se realizó utilizando la micobacteria a una concentración de 1-4x10⁹ en medio PBS pH 9.1. Se disolvió 1 mg de FLUOS en 50 µL de DMSO, y se añadió al vial con *M. tuberculosis* 25 µL de FLUOS/DMSO, posteriormente, fue mezclado 10 minutos en agitación.

Células y condiciones de cultivo. A menos que se especifique lo contrario, las condiciones de cultivo fueron 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo usado fue RPMI 1640 (BioWhittaker, Walkersville, MD) suplementado con 10% de suero fetal (HyClone, Logan, UT) 50 µM de 2-mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (BioWhittaker, Walkersville, MD).

Diferenciación de monocitos a macrófagos (MDM)

Se obtuvieron 180 mL de sangre periférica de voluntarios sanos bajo consentimiento informado, y la aprobación por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. La separación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fue por centrifugación utilizando

Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Inc.); posteriormente, los monocitos se purificaron por adherencia y cultivaron en botellas de cultivo de 75 cm³ en medio de cultivo RPMI suplementado con suero humano al 10% durante 7 días.

Fraccionamiento subcelular y aislamiento. Los MDM se infectaron con *M. tuberculosis* H37Ra muerta por calor a una multiplicidad de infección (MOI) de 1:30, por una hora, seguido de diferentes tiempos de procesamiento (30-180 min). Las células fueron lavadas, despegadas y resuspendidas en 1 mL de buffer de homogenización (sacarosa 0.25M, y 10 mM de HEPES). Las células se homogenizaron en forma mecánica utilizando un homogenizador (Wheaton), y el porcentaje de lisis celular fue determinado mediante azul de tripano. La homogenización se detuvo al alcanzar un 50 a 70% de lisis. Para eliminar las células intactas y núcleos fue centrifugado a una velocidad de 800 rpm (150 g). Después, el homogenizado se centrifugó sobre una solución de Percoll al 27% (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) a 23,500 rpm (30,000 g) a 4°C durante una hora. El gradiente de Percoll del homogenizado se fraccionó de forma manual en 31 fracciones de 320 µL cada una, desde la parte superior al fondo del tubo. Para la caracterización de fracciones fagolisosomales utilizamos la determinación de β-hexosaminidasa. Brevemente, 50 µL de cada una de las fracciones fueron incubadas con 150 mL de buffer de reacción, el cual contiene 0.1M de ácido morfolinetanesulfónico (MES), 0.2% de Tritón X-100, pH 6.5 y 50 mL de p-nitrofenil-acetil-β-D-glucosaminida. Después de 90 min a 37°C fue parada la reacción con un buffer con glicina 0.5M, pH 10. La densidad óptica se determinó a 405 nm.

Para identificar las fracciones que contenían *M. tuberculosis* la infección fue realizada a través de *M. tuberculosis*/FLUOS (5(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide éster), y mediante fluorometría (405 nm, Fluoroscán Ascent FL labsistem) se cuantificaron las unidades de fluorescencia para cada fracción.

Para identificar las fracciones que contenían membrana plasmática, ésta fue marcada antes de realizar el homogenizado con 0.5 µg/mL sulfa-NHS-LC-biotina (Pierce, Rockford, IL) 4°C por 30 minutos. Brevemente, previo a la homogenización celular, la membrana citoplasmática fue marcada seguido de 10 µg/mL de estreptavidina-FITC (BD Bioscience, San Diego, CA) a 4°C por 40 minutos. La fluorescencia en cada una de las fracciones se determinó mediante fluorometría (Fluoroscán Ascent FL labsistem) a 405 nm y los resultados fueron expresados en unidades de fluorescencia.

RESULTADOS

Caracterización de las fracciones subcelulares de acuerdo con su densidad

Para este estudio utilizamos CMSP, las cuales se purificaron por centrifugación sobre ficoll-hypaque, después, purificamos los monocitos por adherencia y se dejaron en cultivo por 7 días, hasta derivarlos a MDM. Como uno de nuestros objetivos fue la purificación de los fagosomas, infectamos a los macrófagos con *M. tuberculosis* cepa H37Ra para permitir la formación del fagosoma. A continuación, los macrófagos fueron resuspendidos en un buffer con sacarosa 0.25M y 10 mM de HEPES, y se realizó el homogenizado de forma mecánica utilizando un homogenizador de vidrio para romper la membrana celular de una forma controlada hasta obtener un 50-70% de lisis, la viabilidad celular se analizó por tinción con azul de tripano. De esta forma, en el homogenizado se obtuvo una mezcla de células intactas, organelos y núcleos, por lo que se realizó una centrifugación a una velocidad de 800 rpm (150 g) para eliminar células intactas y núcleos. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó sobre una solución de Percoll al 27% a 23,500 rpm (30,000 g) a 4°C durante una hora (figura 1). El gradiente de densidad fue determinado mediante el uso de marcadores de densidad (density markers beads) que comprenden el intervalo de 1.03 a 1.136 g/mL, centrifugadas en el mismo buffer compuesto por sacarosa 0.25M (figura 2).

El gradiente de Percoll del homogenizado se fraccionó de forma manual en 30 fracciones de 320 µL cada una, iniciando en la parte superior del tubo (fracción 1) al fondo del tubo (fracción 30). Nuestros resultados muestran que las fracciones 10 a 14 estaban en una región de baja densidad en el gradiente de Percoll al 27%, lo que corresponde a membrana plasmática de acuerdo con la densidad de 1.040 g/mL (figura 2). Las siguientes fracciones que analizamos de acuerdo con su densidad fueron de la 22 a la 29, las cuales se localizaron en una región de alta densidad, en dicha región se localizan los fagolisosomas con una densidad de 1.109 g/mL (figura 2). También analizamos otras fracciones, como las que van de la 15-20 que de acuerdo con su densidad corresponden a compartimentos endosomales, con una densidad de 1.071 g/mL. Para tener una mejor calidad de nuestra caracterización, corroboramos los resultados de densidad, haciendo una caracterización enzimática más específica.

Caracterización enzimática de fagolisosomas en MDM infectados con M. tuberculosis

Para identificar las fracciones que contienen a los fagosomas *M. tuberculosis* se marcó con FLUOS

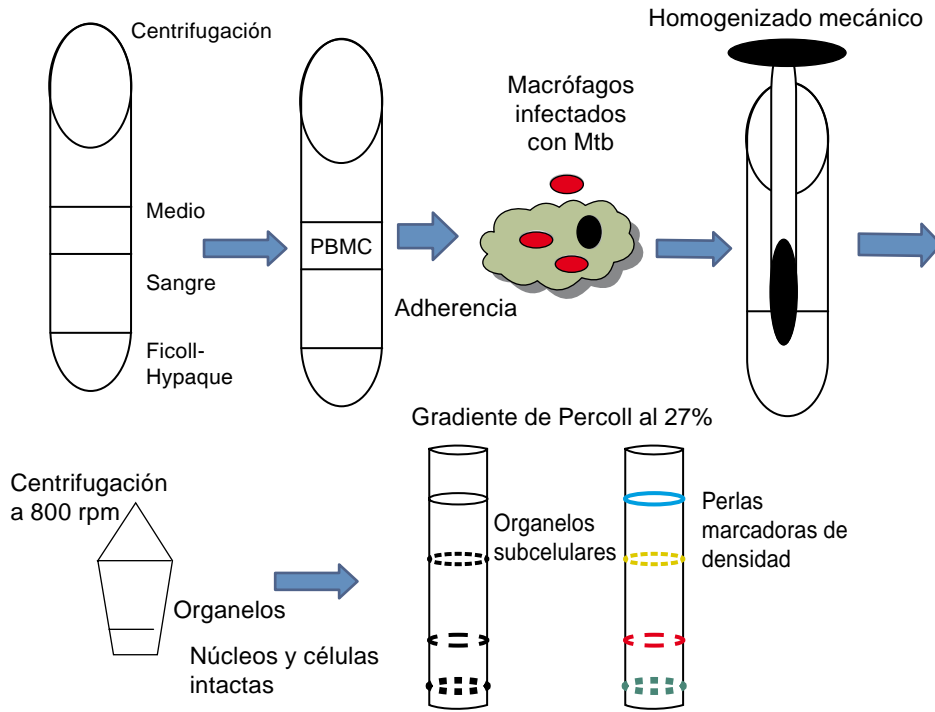


Figura 1. Técnica de purificación de monocitos y aislamiento de organelos mediante gradiente de densidad. Purificación de monocitos de sangre periférica utilizando Ficoll-Hypaque como gradiente de densidad y centrifugación diferencial. Los monocitos obtenidos se adhirieron por 7 días hasta obtener macrófagos. Los macrófagos fueron infectados con *M. tuberculosis* y se realizó homogenización mecánica para poder liberar a los organelos. Se colocaron sobre un gradiente de densidad con Percoll al 27% y mediante ultracentrifugación se aislaron los organelos.

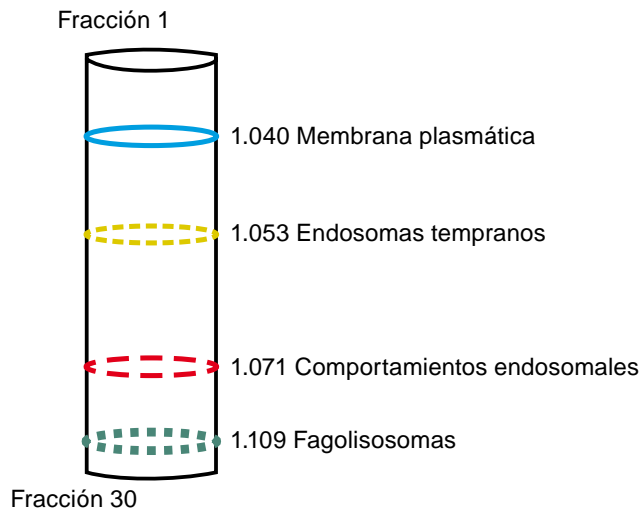


Figura 2. Perlas marcadoras de densidad. Estas perlas se utilizaron para el aislamiento de los organelos de acuerdo con su densidad. El rango de densidad de estas perlas va de 1.0-1.3 g/mL mismo que coincide con la densidad de los organelos subcelulares. Finalmente, se realizó el fraccionamiento para la caracterización enzimática.

5(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide éster), previo a la infección de las MDM y se realizó el homogenizado mecánico seguido de ultracentrifugación sobre un gradiente de Percoll al 27%. Después fue realizado el fraccionamiento subcelular y se monitorizó

cada una de las fracciones mediante fluorimetría. Los resultados muestran la presencia de *M. tuberculosis* marcada con FLUOS en las fracciones 22 a la 29 en una región de alta densidad en el gradiente de Percoll al 27%, coincidiendo con la densidad de los fagosomas (figura 3).

Siendo el fagosoma el sitio donde se inicia el procesamiento antigénico, es importante la adquisición de enzimas lisosomales provenientes de los lisosomas como resultado de la fusión con los fagosomas. Por lo que para poder identificar a los fagolisosomas detectamos a la enzima lisosomal β -hexosaminidasa en las fracciones 23-29, las cuales corresponden con las fracciones en donde localizamos a *M. tuberculosis* teñida con FLUOS e igualmente coincide con la densidad de 1.109 g/mL (figura 4).

Dentro de los organelos importantes en la presentación antigénica está la membrana plasmática, ya que es el destino final de los complejos péptidos-MHC clase II. La identificación de las fracciones que contienen membrana celular se logró mediante la técnica de fluorimetría con sulfa-NHS-LC-biotina, seguido de la incubación con estreptavidina-FITC. La fluorescencia asociada a la membrana plasmática de cada una de las fracciones se determinó mediante fluorimetría y corresponde a las fracciones 10 a 14 en una región de baja densidad en el gradiente de Percoll al 27%, coincidiendo con la densidad de la membrana plasmática de 1.040 g/mL (figura 5).

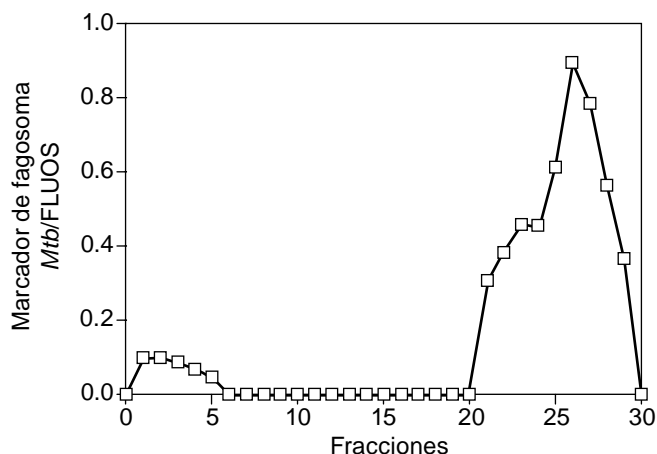


Figura 3. Aislamiento de fagosomas. Se observa la distribución de *M. tuberculosis* teñida con FLUOS en las fracciones 22 a 29. Dato representativo de tres experimentos independientes.

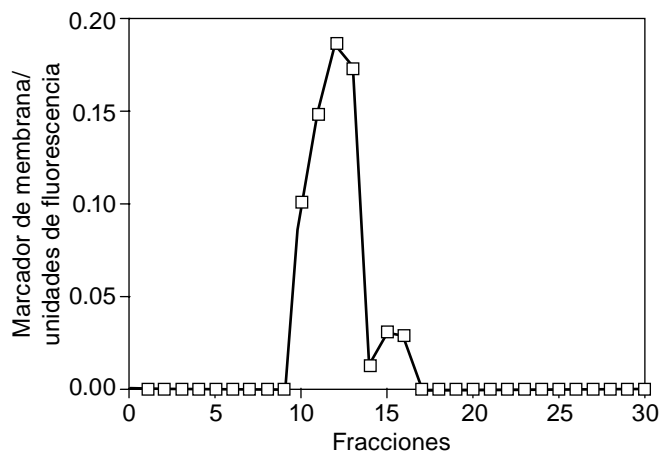


Figura 5. Aislamiento de la membrana plasmática. Distribución de la membrana plasmática en las fracciones subcelulares. La membrana fue marcada con sulfo-NHS-LC-biotin, se lavó e incubó con estreptavidina-fluoresceína antes de realizar el fraccionamiento. Dato representativo de tres experimentos independientes.

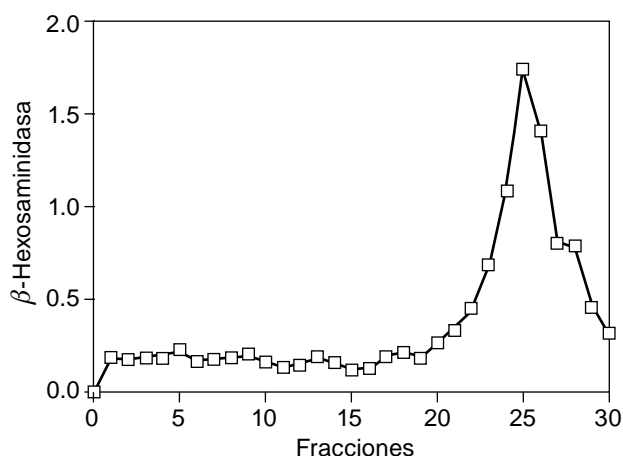


Figura 4. Caracterización enzimática de los fagolisosomas. Observamos la distribución de la enzima lisosomal β -hexosaminidasa en las fracciones subcelulares 23 a 29 las cuales corresponden a las fracciones donde localizamos a *M. tuberculosis*. Dato representativo de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

El fraccionamiento subcelular como herramienta para el estudio de la estructura, la composición y la funcionalidad de los distintos organelos, vesículas y compartimentos celulares ha permitido su caracterización desde el punto de vista bioquímico. En particular, nuestro grupo de trabajo está interesado en el estudio del procesamiento y formación de complejos péptidos-MHC clase II a nivel fagosomal; y para ello, hemos implementado

la purificación basada en las diferencias de densidad de los distintos compartimentos en que se lleva a cabo este proceso. En este trabajo reportamos el uso de ultracentrifugación diferencial y de separación por gradiente de densidad; la combinación de estas técnicas nos permitió aislar y distinguir a la membrana plasmática, a los fagosomas, y a los fagolisosomas para estudiarlos desde el punto de vista estructural.

La figura 2 muestra la densidad correspondiente a cada compartimento. La membrana plasmática fue detectada en las fracciones 10 a 14 con una densidad de 1.040 g/mL. Mientras que los compartimentos endosomales se detectaron en las fracciones 15-20 con una densidad de 1.071 g/mL; por último, los fagolisosomas fueron detectados en las fracciones 22 a 29 con una densidad de 1.109 g/mL. La identidad de los compartimentos fue corroborada mediante la detección de la enzima fagolisosomal β -hexosaminidasa o mediante su caracterización por fluorometría. Estos valores coinciden con los reportados en publicaciones previas por otros grupos de trabajo, aun cuando el proceso de fraccionamiento fue realizado de forma manual.⁹⁻¹³

La particularidad del método que aquí se describe reside en la aplicación de la técnica de ultracentrifugación combinada con la caracterización enzimática de los fagosomas, fagolisosomas y membrana plasmática. Esta técnica es la base para próximos experimentos en donde se necesite conservar sus propiedades biológicas. Los organelos aislados en este trabajo son importantes en el procesamiento y presentación antigénica de tal forma que podría servir para el estudio de la formación de

complejos péptido-MHC, mediante el uso de ensayos funcionales con células T. Existen otros métodos como la electroforesis, donde detectan la unión de los péptidos a los dímeros $\alpha\beta$ de las moléculas MHC clase II, con base en su estabilidad al tratamiento con SDS pero dependen de la existencia de anticuerpos específicos que permitan la identificación del complejo por técnicas inmunoquímicas.^{11,12} En contraste con esos métodos, los ensayos de células T carecen de esa limitante y permiten distinguir la localización de los complejos formados con diferentes antígenos específicos.⁸ Las aplicaciones pueden ser diversas p. ej., nuestro grupo ha aplicado este método en el análisis de las cinéticas del procesamiento de antígenos micobacterianos.^{8,12,13} Se ha logrado hacer un monitoreo de la formación de los complejos antígeno específico-MHC clase II en el curso del catabolismo antigénico y de su procesamiento. Si bien, el seguimiento espacial durante una cinética de procesamiento antigénico podría observarse con mayor detalle mediante técnicas de microscopía electrónica o confocal; dichas técnicas también requieren de la detección inmunoquímica y no permiten la corroboración de que los complejos formados son efectivamente biológicamente activos, es decir, funcionales.^{14,15}

Sin embargo, nuestro enfoque no genera información acerca del porcentaje de carga de las moléculas de clase II o del número de complejos formados. Para obtener dicha información sería necesario combinar el método aquí mostrado con alguna técnica bioquímica o inmunológica. Una posibilidad es la combinación de los ensayos funcionales con una técnica inmunoquímica que añada especificidad y capacidad cuantitativa a nuestro método para poder detectar distintas especies de complejos péptidos-MHC clase II.

Las aplicaciones particulares del método que se describe dependen de las necesidades y creatividad de cada grupo de investigación, pero se propone aquí como una herramienta de gran alcance y bajo costo que podría implementarse en múltiples laboratorios de investigación en inmunología de la comunidad nacional.

REFERENCIAS

1. Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N. *Subcellular fractionation of human neutrophils on Percoll density gradients*. J Immunol Methods 1999;232:131-143.
2. Neves JS, Perez SA, Spencer LA, Melo RC, Weller PF. *Subcellular fractionation of human eosinophils: isolation of functional specific granules on isoosmotic density gradients*. J Immunol Methods 2009;344:64-72.
3. de Araujo ME, Huber LA, Stasyk T. *Isolation of endocytic organelles by density gradient centrifugation*. Methods Mol Biol 2008;424:317-331.
4. Tjelle TE, Brech A, Juvet LK, Griffiths G, Berg T. *Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation*. J Cell Sci 1996;109(Pt 12):2905-2914.
5. Chang J, Ruiz V, Vancura A. *Purification of yeast membranes and organelles by sucrose density gradient centrifugation*. Methods Mol Biol 2008;457:141-149.
6. Strømhaug PE, Berg TO, Fengsrud M, Seglen PO. *Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes*. Biochem J 1998;335(Pt 2):217-224.
7. Gao W, Kang JH, Liao Y, et al. *Biochemical isolation and characterization of the tubulovesicular LC3-positive autophagosomal compartment*. J Biol Chem 2010;285:1371-1383.
8. Torres M, Ramachandra L, Rojas RE, et al. *Role of phagosomes and major histocompatibility complex class II (MHC-II) compartment IN MHC-II antigen processing of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages*. Infect Immun 2006;74:1621-1630.
9. Qiu Y, Xu X, Wandinger-Ness A, Dalke DP, Pierce SK. *Separation of subcellular compartments containing distinct functional forms of MHC class II*. J Cell Biol 1994;125:595-605.
10. Rudensky AY, Maric M, Eastman S, Shoemaker L, DeRoos PC, Blum JS. *Intracellular assembly and transport of endogenous peptide-MHC class II complexes*. Immunity 1994;1:585-594.
11. Ramachandra L, Song R, Harding CV. *Phagosomes are fully competent antigen-processing organelles that mediate the formation of peptide: class II MHC complexes*. J Immunol 1999;162:3263-3272.
12. Ramachandra L, Harding CV. *Phagosomes acquire nascent and recycling class II MHC molecules but primarily use nascent molecules in phagocytic antigen processing*. J Immunol 2000;164:5103-5112.
13. Ramachandra L, Noss E, Boom WH, Harding CV. *Processing of Mycobacterium tuberculosis antigen 85B involves intraphagosomal formation of peptide-major histocompatibility complex II complexes and is inhibited by live bacilli that decrease phagosome maturation*. J Exp Med 2001;194:1421-1432.
14. Deretic V, Via LE, Fratti RA, Deretic D. *Mycobacterial phagosome maturation, rab proteins, and intracellular trafficking*. Electrophoresis 1997;18:2542-2547.
15. Desjardins M, Huber LA, Parton RG, Griffiths G. *Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus*. J Cell Biol 1994;124:677-688.

✉ Correspondencia:

Dra. Martha Torres-Rojas,
Departamento de Investigación en Microbiología,
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas. Calzada de Tlalpan 4502,
colonia Sección XVI. México, D.F., 14080
Correo electrónico: marthatorres98@yahoo.com

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.