



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la respuesta de células T de memoria inducida por las porinas de
Salmonella enterica

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Luis Alberto Ontiveros Padilla

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Constantino III Roberto López Macías

Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, IMSS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Gladis del Carmen Fragoso González

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Rosana Pelayo Camacho

Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS

Ciudad de México. Junio, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Ontiveros Padilla Luis Alberto
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **17 de mayo** del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctor en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Estudio de la respuesta de células T de memoria inducida por las porinas de Salmonella enterica**", dirigida por el/la Dr(a). **López Macías Constantino III Roberto**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Edmundo Calva Mercado
VOCAL	Fernando Roger Esquivel Guadarrama
VOCAL	Edda Lydía Sciutto Conde
VOCAL	Leonor Huerta Hernández
SECRETARIO	María Gloria Soldevila Melgarejo

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 17 de mayo de 2021
COORDINADORA



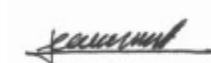
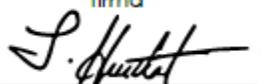
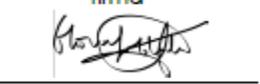
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

SINODALES DESIGNADOS
Presente

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **17 de mayo** del presente año, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctor en Ciencias** del/la estudiante **Ontiveros Padilla Luis Alberto**, con la tesis "**Estudio de la respuesta de células T de memoria inducida por las porinas de Salmonella enterica**", dirigida por el/la Dr(a). **López Macías Constantino III Roberto**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

		Acepto			
PRESIDENTE	Edmundo Calva Mercado	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	31 /05 /2021 fecha	 firma
VOCAL	Fernando Roger Esquivel Guadarrama	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	31 /05 /2021 fecha	 firma
VOCAL	Edda Lydia Sciutto Conde	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	31 /05 /2021 fecha	 firma
VOCAL	Leonor Huerta Hernández	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	28 /05 /2021 fecha	 firma
SECRETARIO	María Gloria Soldevila Melgarejo	Si <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	31 / 05 /2021 fecha	 firma

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 17 de mayo de 2021
COORDINADORA



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Contacto: mdcba@posgrado.unam.mx Tel. 55-5623-7006

El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Este trabajo fue financiado por el IMSS a través de los proyectos FIS/IMSS/PROT/MD/1690, FIS/IMSS/PROT/EMER/1890 y FIS/IMSS/PROT/IT19/1881 y por el CONACYT a través del proyecto FORDECYT/33SE/2020/10/22-03 del programa FORDECYT-PRONACES otorgados al Dr. Constantino López Macías.

Este proyecto fue aprobado por el Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud (CLIEIS) del IMSS con el número R-2019-3601-229.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Constantino López, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, brindarme su confianza y paciencia desde el primer día y a lo largo del desarrollo de este proyecto, por guiarme en el rumbo del proyecto y siempre estar disponible para cualquier vicisitud que se presentó durante todo este tiempo.

A la Dra. Laura Bonifaz y a la Dra. Lourdes Arriaga, por permitirme colaborar con su equipo de trabajo y aprender las técnicas necesarias para llevar a cabo éste trabajo.

A la Dra. Gladis Fragoso y a la Dra. Rosana Pelayo por estar al pendiente de los avances obtenidos en el proyecto y aportar ideas importantes para el desarrollo del mismo.

Al Dr. Rodolfo Pastelin y a la Dra. Tania Rivera, por su apoyo durante el desarrollo del proyecto y por brindarme consejos técnicos y científicos al desarrollar mis experimentos.

Al M. en C. Alberto García Lozano, porque me permitió aprender de él las técnicas y metodología necesaria para llevar a cabo el presente trabajo, sin sus enseñanzas nada de esto hubiera sido posible.

A mis compañeros de la UIMIQ, Ruth Maderas, Vanessa Rivero, Stephanie Saint-Remy, Diana Pacheco, Gonzalo González, Alejandro Torres y Oscar Arteaga, por participar siempre en la discusión de los resultados, aportar ideas y por brindarme su apoyo incondicional.

A la Dra. Ingeborg Becker y a la MVZ Anayantzin Heredia por su apoyo durante los experimentos realizados en el bioterio de la unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Al CONACYT y la UNAM por el apoyo económico y académico que recibí durante la realización de mis estudios de doctorado.

DEDICATORIAS

A mis padres, por haber sido mi mejor ejemplo para esforzarme siempre y alcanzar mis sueños, por todo su cariño y apoyo en momentos difíciles.

A mis hermanos, Lourdes y Gerardo, por tener en ustedes a mis mejores amigos.

A mi familia, tíos, primos y abuelos por brindarme afecto cuando más lo necesité y ser mi soporte para enfrentar nuevos retos.

A mis amigos, Juan Manuel, Manuel, Armando, Ricardo, Víctor, Omar y Alejandro, por la ayuda y alegría que me han ofrecido en todo momento desde nuestra niñez.

CONTENIDO

Introducción.....	13
Justificación.....	18
Planteamiento del problema.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Particulares.....	19
Hipótesis.....	20
Diseño experimental y métodos.....	20
Animales de laboratorio.....	20
Biológicos.....	20
Resultados.....	24
La inmunización con porinas de <i>S. Typhi</i> induce una respuesta de células T CD4+ y CD8+.....	24
La inmunización con porinas de <i>S. Typhi</i> induce una respuesta funcional de células T CD4+ y CD8 + de memoria residente y efectora.....	27
La inmunización con porinas de <i>S. Typhi</i> induce una respuesta funcional de células T CD4 + y CD8 + de memoria central.....	29
La inmunización con porinas de <i>S. Typhi</i> reduce la carga bacteriana después del reto.....	31
Las células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante son cruciales en la protección inducida por las porinas de <i>S. Typhi</i>	33
Discusión.....	36
Conclusión.....	40
Perspectivas.....	41
Bibliografía.....	41

RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

La inmunización con porinas de <i>S. Typhi</i> induce una respuesta de células T CD4+ y CD8+.....	26
La inmunización con porinas de <i>S. Typhi</i> induce una respuesta funcional de células T CD4+ y CD8 + de memoria residente y efectora.....	28
La inmunización con porinas de <i>S. Typhi</i> induce una respuesta funcional de células T CD4 + y CD8 + de memoria central.....	30
La inmunización con porinas de <i>S. Typhi</i> reduce la carga bacteriana después del reto.....	32
Las células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante son cruciales en la protección inducida por las porinas de <i>S. Typhi</i>	36

ABREVIATURAS

S. Typhi	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi
Omp	Proteína de membrana externa
Por	Porinas de <i>Salmonella</i> Typhi
Veh	Vehículo de inmunización para porinas
PorK	Porinas digeridas en proteinasa K
PorID	Porinas inmunizadas vía intradérmica
PorIP	Porinas inmunizadas vía intraperitoneal
HIS	<i>Salmonella</i> Typhi inactivada por calor
DTH	Hipersensibilidad de tipo retardada
LT	Linfocitos T
LTM	Linfocitos T de memoria
LTMC	Linfocitos T de memoria efectora
LTME	Linfocitos T de memoria efectora
LTRM	Linfocitos T residentes de memoria
TCR	Receptor de células T
N	Naive / Virgen
EM	Memoria efectora
CM	Memoria central
RM	Residente de Memoria
GLD	Ganglio linfático drenante

RESUMEN

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) es un patógeno que representa un grave problema de salud pública, especialmente en los países en vías de desarrollo; el desarrollo de vacunas seguras y eficaces contra *S. Typhi* es de gran importancia en la investigación médica. Las porinas de *S. Typhi*, OmpC y OmpF, son potentes inductores de la respuesta inmune protectora contra *S. Typhi* en ratones y humanos. La vacunación con porinas induce protección contra 500 DL₅₀ de la bacteria *S. Typhi*, la presencia de anticuerpos bactericidas de duración vitalicia y una respuesta efectora de células T en ratones; sin embargo, se desconoce si existe inducción del compartimiento de células T de memoria, así como su contribución a la protección.

En el presente trabajo, primeramente, observamos que la inmunización con porinas es capaz de inducir respuesta de células T CD4+ y CD8+ *in situ* en el sitio de inmunización. El análisis de la respuesta funcional específica contra porinas por parte de las células T CD4+ y CD8+ de la piel inmunizada mostró células productoras de IFN-gama e IL-17 en ambas poblaciones de células T. El fenotipo de memoria de las células T indicaban la presencia de células T CD4+ y CD8+ de memoria residente y de memoria efectora en la piel inmunizada, mientras que en el ganglio linfático drenante se encontraron células con fenotipo de memoria central.

De igual forma se demostró que la inmunización con porinas por vía intradérmica, redujo la carga bacteriana después del reto con *S. Typhi*, y finalmente, evaluando el papel de la subpoblación circulante de las células T de memoria en la protección, se demostró que las células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante son cruciales en la protección mediada por la inmunización con porinas en contra de *S. Typhi*.

En su conjunto, nuestros resultados resaltan la importancia de inducir una respuesta de células T de memoria circulante para alcanzar la optima protección conferida por la inmunización con porinas, mostrando un mecanismo importante a analizar durante el desarrollo racional de vacunas.

ABSTRACT

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) is a pathogen bacteria that represents a severe public health problem worldwide, specially in the low and middle income countries; the development of safe and more efficient vaccines against *S. Typhi* is a very important topic in medical research. *S. Typhi* porins, OmpC and OmpF, are potent inducers of the immune response against *S. Typhi* in mice and humans. Vaccination with porins induces the protection against 500 LD₅₀ of *S. Typhi*, life-lasting bactericidal antibodies and effector T cell responses in mice; however, the nature of the memory T cell compartment and its contribution to protection remains unknown.

In this work, we firstly observed that immunization with porins induces *in situ* (skin) CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses. Analysis of the porin-specific functional responses of skin CD4⁺ and CD8⁺ T cells showed IFN-gamma- and IL-17-producing cells in both T cell populations. The memory phenotype of porin-specific T cells indicated the presence of resident and effector memory phenotypes in the skin, and a central memory phenotype in the skin-draining lymph node.

In addition, we demonstrated that immunization with porins via skin reduces the bacterial burden following challenge. Finally, evaluating the role of the circulating T cell memory population in protection, we showed that circulating memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells are crucial in porin-mediated protection against *S. Typhi*.

Overall, this study highlights the importance of inducing circulating memory T cell responses in order to achieve the optimal protection provided by porins, showing a mechanism that could be sought in the rational development of vaccines.

INTRODUCCIÓN

Porinas de *Salmonella* Typhi como vacuna contra la fiebre tifoidea.

Salmonella enterica es una bacteria patógena para el ser humano y representa un grave problema de salud a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud ha declarado a *Salmonella sp.* como una bacteria de alta prioridad contra la cual desarrollar vacunas, debido a la creciente resistencia a antimicrobianos que presenta (WHO, 2017). *Salmonella enterica* serovariedad Typhi (*S. Typhi*) es causante de la fiebre tifoidea, de la que se reportan entre 11 y 21 millones de casos, así como entre 117,000 y 161,000 muertes anuales a nivel mundial (Stanaway et al., 2019). El desarrollo de vacunas contra *Salmonella enterica* continúa siendo un reto para la investigación clínica, actualmente sólo se han licenciado 3 vacunas contra fiebre tifoidea, algunas de ellas tienen limitaciones de efectividad en niños menores de 5 años, otras requieren de varias dosis de administración, y ninguna de ellas es capaz de inducir protección cruzada contra las serovariedades no tifoideas, las cuales también son de relevancia médica debido a que causan más de 150 millones de infecciones y cerca de 57,000 muertes anualmente en el mundo (Gayet et al., 2017; Jessica M. Healy, 2019). Por las anteriores razones, la búsqueda de vacunas efectivas contra la enfermedad es prioritario en la investigación médica y por ello es que la búsqueda de vacunas efectivas contra la infección por *S. Typhi* está en continuo avance.

En nuestro grupo de trabajo se encontró que los sueros de pacientes con fiebre tifoidea en fase aguda y convaleciente contenían altos títulos de anticuerpos IgG e IgM (respectivamente) específicos para proteínas de membrana externa (Omp) de *Salmonella* Typhi. Éstas Omp's corresponden a un peso molecular de 34 y 37 KDa y se habían descrito anteriormente como porinas (Ortiz et al., 1989).

Las porinas son las proteínas de membrana externa más abundantes en bacterias Gram negativas, cada bacteria expresa aproximadamente 10^5 moléculas en su

superficie. Su principal función es facilitar el transporte de solutos hidrofílicos con un peso molecular menor a 600 Da a través de la membrana externa (Nikaido, 2003; Welte et al., 1995). Estas proteínas fueron purificadas de *Salmonella Typhi* mediante el método de Nikaido y se inmunizaron ratones con las porinas purificadas. Los ratones inmunizados con porinas purificadas fueron protegidos ante un reto de 500 DL₅₀ de ésta bacteria (Armando Isibasi et al., 1992).

Las porinas purificadas con estándares de buenas prácticas de manufactura, pasaron los exámenes de toxicidad y preclínicos. En el ensayo clínico fase 1, se encontró que las porinas fueron seguras, bien toleradas e indujeron proliferación de células mononucleares de sangre periférica y linfocitos T productores de Interferón gamma (Salazar-González et al., 2004).

Por otro lado, se evaluó la respuesta de anticuerpos en los voluntarios del ensayo clínico 11 años después de la administración de una sola dosis de 10 microgramos de porinas, y se encontró la presencia de 4 títulos de anticuerpos IgG e IgM contra la bacteria por encima de los títulos del grupo control (Perez-Shibayama et al., 2014).

En estudios preclínicos hechos en ratones inmunizados con dos dosis de 10 microgramos de porinas, en los que se encontró que la inmunización con porinas indujo anticuerpos bactericidas y que estos anticuerpos se mantenían a lo largo de toda la vida de los ratones (Secundino et al., 2006). Esta respuesta de anticuerpos inducida por la inmunización con porinas sin adyuvante es un comportamiento poco común ante inmunizaciones con otras proteínas bacterianas, por ejemplo, otros estudios de medición de anticuerpos tras inmunizaciones con proteínas de superficie externa (Osp) de otras bacterias Gram(-) como *Borrelia burgdorferi*, en los que la respuesta de anticuerpos decae antes de los 30 días después de la última inmunización (Padilla et al., 1996).

En su conjunto, los resultados obtenidos señalan que las porinas son potentes inmunógenos capaces de inducir de manera segura anticuerpos bactericidas de larga duración, propiedad de suma relevancia para el diseño racional de nuevas vacunas y adyuvantes, ya que se buscan inmunógenos seguros que induzcan protección de larga duración. Se podría pensar ésta respuesta tan robusta de anticuerpos sería suficiente para inducir protección por sí sola, sin embargo, se demostró que la inmunización activa protege contra 500 DL50, mientras que la inmunización pasiva con anticuerpos anti-porinas demostró protección hasta con 100 DL50 (A. Isibasi et al., 1988). Esto indica que existen mecanismos adicionales a la inmunidad humoral que participan en la protección contra la bacteria inducida por porinas. Por lo anterior, se han seguido buscando diversos mecanismos del sistema inmune involucrados en la protección de larga duración inducida por las porinas, para conocer cuáles son las características a buscar en el desarrollo de nuevas vacunas.

La inusual capacidad inmunogénica de las porinas hacía evidente la participación de la respuesta inmune innata y una probable actividad adyuvante intrínseca de las mismas. Debido a lo anterior, se investigó si las porinas pueden ser reconocidas por el sistema inmune innato, para ello se utilizó un modelo de células HEK transfectadas con los receptores TLR2 y TLR4, las cuales, al ser estimuladas con porinas, produjeron citocinas, lo que indicaba que las porinas son capaces de ser reconocidas por estos receptores del sistema inmune innato (Pérez-Toledo et al., 2017). Además de ello, se ha reportado que la co-inmunización de las porinas como adyuvantes de virus de influenza inactivado, antígeno Vi, ovoalbúmina, inducen un efecto adyuvante sobre la respuesta de anticuerpos específica contra los antígenos co-inmunizados (Moreno-Eutimio et al., 2013).

Otro mecanismo importante en la protección que fue investigado, fue la respuesta efectora de células T ante porinas, ya que se ha demostrado que las porinas son un blanco importante de la respuesta de células T en personas inmunizadas con la vacuna viva atenuada contra *S. Typhi* (Carreño et al., 2017). De igual forma, existen

reportes que demuestran la activación *ex vivo* de linfocitos T CD4+ humanos por su estimulación con péptidos inmunogénicos de la porina OmpC, los cuales son conservados dentro de las diferentes serovariedades de *Salmonella enterica*; sugiriendo que los linfocitos T CD4+ juegan un papel importante en la protección inducida por las porinas (Díaz-Quíñonez et al., 2004; Valero-Pacheco et al., 2020).

Por otra parte, se encontró que las porinas son capaces de activar una respuesta efectora de células T en ratones, ya que tras su inmunización se indujo la proliferación de linfocitos T CD4+ en ratones inmunizados y se observó que estas células se encargaban de producir IFN- γ (Perez-Shibayama et al., 2014). El mismo efecto se observó en humanos vacunados con porinas, encontrando un incremento significativo en el índice de proliferación de células mononucleares de sangre periférica caracterizada por la presencia de IFN- γ (Blanco et al., 1993; Salazar-González et al., 2004).

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado ampliamente la capacidad de las porinas para activar linfocitos T y su función efectora tras la inmunización, sin embargo, se desconoce si estas proteínas son capaces de inducir compartimento de memoria o larga vida en los linfocitos T específicos contra porinas.

Linfocitos T de memoria

Al momento de la selección tímica, los linfocitos T se pueden diferenciar a células efectoras con capacidad citotóxica (en el caso de las células T CD8+) o con capacidad de producir citocinas que atraerán y activarán otras células de la respuesta inmune (en el caso de las células T CD4+). Para ambas poblaciones de linfocitos T, se ha descrito que tras una función efectora contra un antígeno o un patógeno, poseen capacidad de convertirse en células de memoria de larga vida con capacidad funcional cuando han sido activadas y se reestiman específicamente (Seder & Ahmed, 2003).

Los Linfocitos T de memoria (LTM) generados tras el primer encuentro con un patógeno se dividen en tres subpoblaciones: ya que algunos pueden mantenerse en circulación sistémica (linfocitos T de memoria efectora o memoria circulante - LTME), otros se quedan residiendo en un tejido específico para montar una respuesta inmune local ante el patógeno (linfocitos T residentes de memoria - LTRM) y otros permanecen en el ganglio linfático drenante (GLD) para servir de provisión para los LTM o LTRM que se irán a circulación o tejidos (Di Meglio et al., 2011).

Estas células se pueden identificar principalmente por su inmunofenotipo, mediante la expresión diferencial de moléculas como CD44, CD62L y moléculas que inhiben el regreso a GLD o las mantienen en otros tejidos, como CD69 y CD103. Se ha definido a los LTMC como una población celular CD44+, CD62L+ y CD103-; a los LTME como una población CD44+, CD62L-, CD103- y a los LTRM como una población CD44+, CD62L-, CD103+ (Gray et al., 2018; Steinbach et al., 2018). Además de ello, las células T de memoria residente se encuentran en órganos y tejidos que son difíciles de alcanzar por las células T de memoria circulante o efectora, como la mucosa intestinal o de pulmón (Szabo et al., 2019).

Existen varios reportes en los que se trata de dilucidar la participación de las poblaciones de células T de memoria circulante o residente en la protección contra diferentes patógenos y contra cáncer. Se ha reportado que vías de inmunización como la intradérmica son capaces de inducir LTRM en sitios distantes al sitio inmunizado, y a su vez, éstos LTRM están involucrados en la resolución de inmunopatologías como el melanoma (León-Letelier et al., 2020), además se ha comprobado que su transferencia singénica puede inducir presencia sistémica de LTRM y un estímulo antigénico es capaz de expandir las clonas presentes en las zonas distintas a la originalmente trasplantada (Beura et al., 2018).

De igual forma, se ha descrito que la transferencia de LTM circulante específicos contra *Yersinia pseudotuberculosis* de tejido adiposo en ratones deficientes de Rag

(recombinasa que genera a los linfocitos T y B) es capaz de proteger al 70% de los ratones ante un reto con la bacteria, observando que la protección se pierde al eliminar dichas células (Han et al., 2017). Por otra parte, existe evidencia de que los LTRM también contribuyen a la protección contra el virus de influenza (Teijaro et al., 2011). Esto demuestra que las células de memoria tienen un papel fundamental en la protección inducida contra una infección. En el caso propio de la infección por *S. Typhi*, se ha demostrado que la protección óptima inducida por la vacuna viva atenuada de la bacteria requiere de la participación tanto de la población circulante como de la residente de tejidos (Benoun et al., 2018).

La inmunización de antígenos en piel por la vía intradérmica es un modelo ampliamente usado para el estudio de la inducción de células T de memoria después de la inmunización. Esta ruta de inmunización ha probado ser útil para evidenciar la presencia de las tres subpoblaciones de LTM descritas anteriormente (LTMC, LTME, LTRM) (Antonio-Herrera et al., 2018; García-Lozano et al., 2018), por lo que se empleará en éste proyecto como ruta de inmunización para identificar y evaluar la respuesta de células T de memoria inducida por las porinas.

En el presente proyecto se desea conocer si la inmunización con porinas es capaz de inducir subpoblaciones de LTM, así como la probable contribución que tienen en la protección conferida por las porinas contra el reto de *S. Typhi*.

II.- JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Las células T de memoria son un elemento importante de la protección contra diferentes microorganismos, en el caso de la inmunización con porinas se desconoce si se puede generar el compartimento de memoria de células T y si dicho compartimento contribuye en la protección inducida por estas proteínas. Se desea generar este conocimiento ya que es de gran importancia para conocer los mecanismos de protección e inmunidad de larga duración contra *S. Typhi*.

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado previamente que la inmunización con porinas es fuertemente protectora e induce mecanismos como la generación de anticuerpos bactericidas de larga duración y una respuesta efectora de células T específicas. Se desconoce si, después de dicha respuesta efectora de linfocitos T, estas células tienen capacidad de permanecer en el organismo como células de memoria y si contribuyen directamente a la protección contra *S. Typhi*.

IV.- OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el compartimento de memoria de linfocitos T inducidos por las porinas y su contribución en la protección contra *S. Typhi*.

V.- OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar si la inmunización con porinas vía intradérmica induce una respuesta celular de linfocitos T CD4+ y CD8+ en un modelo de ratón.
- 2.- Identificar la presencia de linfocitos T de memoria residente y efectora CD4+ y CD8+ inducidos por la inmunización con porinas en un modelo de ratón.
- 3.- Identificar la presencia de linfocitos T de memoria central CD4+ y CD8+ inducidos por la inmunización con porinas en un modelo de ratón.
- 4.- Determinar la inmunogenicidad y capacidad protectora de las porinas de *S. Typhi* al ser inmunizadas por vía intradérmica en un modelo de ratón.
- 5.- Evaluar la contribución de los linfocitos T de memoria circulante y residente CD4+ y CD8+ en la protección contra *S. Typhi* inducida por la inmunización con porinas en un modelo de ratón.

VI.- HIPÓTESIS

La inmunización intradérmica con porinas inducirá linfocitos T de memoria circulante y residente CD4+ y CD8+ que estarán contribuyendo directamente a una respuesta protectora contra *S. Typhi*.

VII.- DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

Animales de Laboratorio

Los animales que se usaron en el desarrollo de este proyecto fueron ratones machos de 6-8 semanas de la cepa C57BL6/J, los cuales se adquirieron de la casa comercial Bioinvert® y se mantuvieron durante la duración de los experimentos en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Biológicos

Porinas purificadas por el método modificado de Nikaido previamente descrito (Salazar-González et al., 2004) a partir de la cepa de *Salmonella Typhi* ATCC 9993, son producidas en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI. Cada lote es producido bajo las buenas prácticas de laboratorio y se le realiza un control de calidad al producto terminado, incluyendo la detección de endotoxina (Lipopolisacárido) mediante la prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus*.

Salmonella Typhi ATCC 9993, conservada en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (UIMIQ) del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI. Para los experimentos de reto, se crece la bacteria en medio LB líquido

hasta tener una concentración de 10^7 UFC / mL, alícuotas con esta concentración de bacteria se usaron para la inyección de la bacteria en el reto. Como control positivo de los experimentos se hicieron inmunizaciones con Salmonella inactivada por calor (HIS), en el que se crece la bacteria hasta tener una concentración de 10^7 UFC/mL y se calienta cada alícuota de 1 mL a 60°C por 2 horas para inactivar a la bacteria.

Porinas digeridas con proteinasa K (PorK), el cual es una preparación usada como control negativo en los experimentos para evidenciar el potencial efecto que tiene el lipopolisacárido que estuviera debajo del límite de detección de la prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus* (0.2 ng LPS / mg proteína), para prepararla se mezcla 1 μg de proteinasa K (New England Biolabs cat. 8102, Ipswich, MA, USA) con 100 μg de porinas y se incuban a 37°C por 2 horas, transcurrido dicho tiempo se calienta la preparación a 60°C por 10 minutos.

Inmunizaciones

Se inmunizaron ratones en un esquema de dos inmunizaciones al día 0 y 14 con los controles y problemas descritos a continuación:

- a) Vehículo (Veh): Buffer Tris en el que son inmunizadas las porinas, se inyectaron 10 μL de este buffer por vía intradérmica en la oreja del ratón.
- b) Porinas digeridas en proteinasa K (PorK): Inmunización con 10 μg de porinas de *S. Typhi* digerida en proteinasa K por vía intradérmica en la oreja del ratón.
- c) PorID: Muestra problema que consiste en la inmunización vía intradérmica de 10 μg de porinas en la oreja del ratón.
- d) PorIP: Inmunización vía de 10 μg de porinas por vía intraperitoneal en el ratón.
- e) HIS: Inmunización intraperitoneal de 10^7 UFC de *S. Typhi* inactivada por calor. A todas las dosis inmunizadas se le hizo la prueba de crecimiento en placa y resultó negativa para crecimiento bacteriano.

Hipersensibilidad de Tipo Retardada (DTH)

La evaluación de la respuesta de DTH se llevó a cabo realizando mediciones del grosor de la oreja inmunizada del ratón a las 0, 24 y 48 horas después del refuerzo con ayuda de un micrómetro (Truper cat. 14401, Mexico City, Mexico).

Extracción y estimulación de células T

Las células totales de la piel inmunizada y del ganglio linfático drenante de los ratones inmunizados se extrajeron de los órganos completos, los cuales fueron macerados en medio de cultivo RPMI suplementado (Gibco cat. 1640, Waltham, MA, USA) e incubados por 24 horas a 37°C. Tras la incubación las células se extrajeron del cultivo mediante centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos. Se hizo el conteo de las células extraídas con azul tripano al 0.4% y una cámara de conteo de Neubauer. 10⁶ células vivas extraídas de la piel y el ganglio fueron estimuladas con los péptidos OmpC₂₄₁₋₂₅₅ (0.5 µg) y OmpF₂₀₁₋₂₁₅ (0.5 µg) por 6 horas a 37°C para evaluar la producción de citocinas.

Inmunofenotipificación de las células T

Después de haber concluido el tiempo de estimulación. Se realizó una tinción extracelular con los anticuerpos anti-ratón TCR-β (Biolegend cat. 109228, San Diego, CA, USA), CD4 (Biolegend cat. 100414, San Diego, CA, USA), CD8-α (Biolegend cat. 100725, USA), CD44 (BD cat. 563114, Franklin Lakes, NJ, USA), CD62L (Biolegend cat. 104408, San Diego, CA, USA) y CD103 (Biolegend cat. 121426, San Diego, CA, USA), realizada por 20 minutos a 4°C en oscuridad en suero fetal bovino (Sigma cat. 2442, St. Louis, MO, USA) al 10% en PBS 1X. Se realizó una tinción intracelular con el kit "fix and perm" (BD cat. 554714, Franklin Lakes, NJ, USA) y los anticuerpos anti-ratón IFN-γ (Biolegend cat. 505806, San Diego, CA, USA) e IL-17 (Biolegend cat. 506916, San Diego, CA, USA) por 45

minutos a 4°C y en oscuridad. La identificación y cuantificación de las células se realizó por citometría de flujo en el citómetro BD FACS Canto II (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) del centro de instrumentos del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “Siglo XXI”, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Cuantificación de títulos de anticuerpos IgM e IgG.

Los ratones inmunizados fueron sangrados por punción en la vena submandibular al día 28 post-inmunización, la sangre se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos y el suero fue recolectado. Los títulos de anticuerpos específicos contra porinas se evaluaron mediante ELISA en una placa de 96 pozos fondo plano (Corning cat. 3590, Corning, NY, USA), en la que se sensibilizó 1 µg de porinas en 100 µL de buffer de carbonatos pH=9.6 por pozo. El suero se diluyó en proporciones 1:2 en una solución de leche en polvo baja en grasa al 5% en PBS 1X a lo largo de la placa. Los anticuerpos presentes en el suero se detectaron con los anticuerpos secundarios anti-ratón HRP IgM (Invitrogen cat. 62-6820, Waltham, MA, USA) o IgG (Invitrogen cat. 62-6520, Waltham, MA, USA) en dilución 1:400 en leche al 5% en PBS 1X. Las placas se revelaron con 10 µg de o-fenilendiamina (Thermo Scientific cat. 34005, Waltham, MA, USA) y 10 µL de peróxido de hidrógeno (Sigma cat. H1009, St. Louis, MO, USA) en 100 µL de buffer de citratos (pH = 4.5) por pozo por 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se adicionó a cada pozo 10 µL de ácido sulfúrico 2.5 N y se leyeron las absorbancias de los pozos a 492 nm en un lector de placas (Thermofisher Multiskan 355, Waltham, MA, USA).

Eliminación de células CD4+ y CD8+

A tres grupos de ratones inmunizados con PorID se les administraron intraperitonealmente los anticuerpos monoclonales anti-CD4 (clona GK1.5, 400 µg / día), anti-CD8 (clona TIB-210, 200 µg / día) y el control de isotipo (clona III-10, 400 µg / día) a los días 25, 28 y 31 post-inmunización.

Reto con *S. Typhi* y conteo de carga bacteriana

Los diferentes grupos de ratones fueron administrados intraperitonealmente con 10^5 (Fig. 4) o 10^8 (Fig. 5) UFC de *S. Typhi* al día 28 post-inmunización. Un día (Figura 4) o cinco días (Figura 5) después del reto, se extrajo el bazo y el hígado de los ratones y se maceraron los órganos en PBS 1X estéril. El macerado se diluyó 1:10 y 1:100 en PBS 1X estéril y se cultivaron las diluciones en placas con medio LB (Sigma cat. L2897, St. Louis, MO, USA) por 14 horas a 37°C. Después de la incubación se contaron las UFC / g de órgano de cada ratón.

Ensayo de supervivencia y escala clínica

La supervivencia de los ratones retados con 10^8 UFC de *S. Typhi* se siguió durante los 5 días siguientes al reto, en ese tiempo se registraron los signos clínicos que presentaban los ratones y de acuerdo al número de signos presentados se le asignó a cada grupo de ratones una escala clínica del 1-5 previamente descrita (Burkholder et al., 2012), en el que la escala de 5 era la de peor diagnóstico para la supervivencia.

VIII.- RESULTADOS

La inmunización con porinas de *S. Typhi* induce una respuesta de células T CD4+ y CD8+

Para probar si la inmunización con porinas podría inducir respuestas de células T que nos permitiría buscar diferentes subpoblaciones de células T de memoria, inmunizamos ratones usando una estrategia de inmunización y refuerzo seguida de una prueba de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH). Para evidenciar la presencia de una respuesta celular local contra las porinas, la prueba de DTH se llevó a cabo en un grupo de ratones que fueron inmunizados dos veces con porinas

por vía intradérmica (PorID). Por otro lado, otro grupo fue inmunizado primero con porinas intraperitonealmente (PorIP) y reforzado con PorID, donde una respuesta de DTH positiva indicaría que la primera inmunización con PorIP creó una respuesta celular sistémica que llegó a la piel y luego se expandió siguiendo una respuesta local. Todos los grupos experimentales se reforzaron con PorID (Figura 1A). La prueba DTH mostró una respuesta celular sostenida en ambos grupos, denotada por un persistente aumento del grosor de la piel a las 24 y 48 h posteriores al refuerzo en el sitio inmunizado (Figura 1B). La respuesta DTH positiva en ambos grupos de ratones inmunizados con porinas sugirió la presencia de una respuesta celular local y sistémica independientemente de la ruta de inmunización utilizada para en la primera inmunización.

Luego se quiso corroborar que la respuesta DTH después de la inmunización fue una consecuencia de un aumento en el número de células T en el sitio de inmunización. Usando citometría de flujo, se encontraron poblaciones más abundantes de células T CD4+ y CD8+ en la piel de ratones vacunados con porinas, especialmente en el grupo PorID (Figura 1C). Las cuantificaciones celulares mostraron que el conteo total las células T CD4+ en la piel de ratones vacunados fueron tres veces más altos en comparación con los grupos control negativo (Vehículo y PorK) (Figura 1D). Un incremento parecido se encontró para el caso de las células T CD8+ de la piel inmunizada, en el que se observó un incremento en el número total de estas células en los ratones inmunizados con porinas (Figura 1E).

Para comprobar si la respuesta DTH positiva y el aumento de linfocitos T CD4+ y CD8+ en los ratones inmunizados con porinas, estaban relacionados con la presencia local y sistémica de células T de memoria (residentes y circulantes), se procedió a caracterizar el fenotipo de la memoria y la funcionalidad de las células T presentes en la piel.

La inmunización con porinas de *S. Typhi* induce una respuesta funcional de células T CD4+ y CD8 + de memoria residente y efectora

Primero se evaluó la especificidad y la funcionalidad de las células T CD4+ y CD8+ de la piel a través de la expresión de IFN- γ e IL-17, citocinas producidas como consecuencia de una respuesta de recuerdo específica de la porina (Perez-Shibayama et al., 2014; Pérez-Toledo et al., 2017). El perfil específico de citocinas de las células T en la piel inmunizada de los ratones reveló la expresión de IFN- γ e IL-17 por parte de las células T CD4+ después de la estimulación con los péptidos OmpC₂₄₁₋₂₅₅ y OmpF₂₀₁₋₂₁₅ (Figura 2A). En concordancia, el número total de células T CD4+ productoras de IFN- γ en la piel de los ratones inmunizados con porinas se encontraba incrementado cerca de siete veces con respecto a la cantidad de células IFN- γ + en los controles negativos (Figura 2B). Del mismo modo, el número total de células T CD4+ positivas para IL-17 representó un aumento de cinco veces en los ratones inmunizados con porinas en comparación con los controles (Figura 2C). También fue evidente la presencia de células T CD8+ funcionales en la piel; se logró observar un aumento en el número total de células T CD8+ productoras de IFN- γ (Figura 2D). Por otro lado, aunque en el porcentaje de células T CD8+ que expresan IL-17 no se obtuvo diferencias significativas en comparación con los controles negativos, si se observó un incremento en el número total de células T CD8+ productoras de IL-17 en la piel de los ratones inmunizados (Figura 2E).

Para evaluar si las células T específicas contra porinas que se encontraron en la piel de los ratones vacunados tenían un fenotipo de memoria, analizamos la expresión de los marcadores CD62L y CD103 en las células T CD4+ productoras de IFN- γ e IL-17 de la piel (Figura 2F). Se pudo observar la presencia de células T CD4+ y CD8+ específicas de memoria residente (Figura 2G y 2H) y memoria efectora (Figura 2I y 2J) en la piel de los ratones inmunizados con porinas, mientras que estas subpoblaciones de células T de memoria estuvieron casi ausentes en los grupos de controles negativos. El número de células T CD4+ y CD8+ de memoria central no se encontró incrementado en la piel de los ratones inmunizados, debido

a que las células T de memoria central se encuentran localizados principalmente en órganos linfoides, su presencia en el ganglio linfático drenante de la piel (GLD) fue investigado más a fondo.

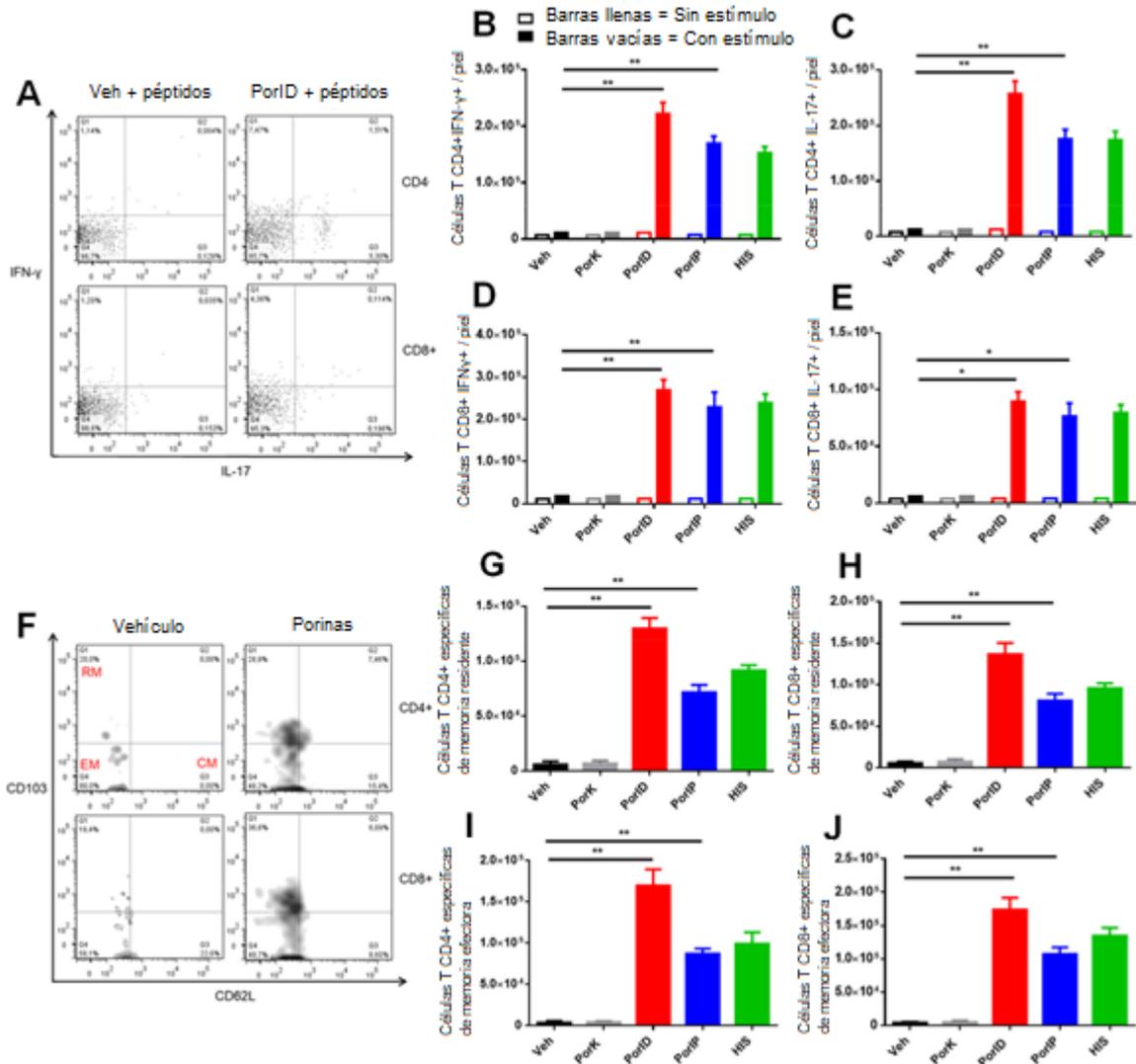


Figura 2. La inmunización con porinas de *S. Typhi* induce una respuesta funcional de células T CD4+ y CD8 + de memoria residente y efectora. Ratones C57BL/6J fueron inmunizados intradérmicamente en la oreja con vehículo (Veh), porinas digeridas con proteinasa K (PorK) y porinas (PorID), intraperitonealmente con porinas (PorIP) o *S. Typhi* inactivada por calor (HIS) al día 0. Todos los grupos recibieron un refuerzo al día 14 con porinas vía intradérmica en la oreja. Se extrajeron las células de la piel y se evaluó la producción de IFN- γ e IL-17 (A) como medida de la funcionalidad de las células T CD4+

(B,C) y CD8+ (D,E). A las células funcionales CD44+ se les determinó su fenotipo de memoria mediante la expresión de CD103 y CD62L (F), evaluando la cantidad de células T CD4+ y CD8+ de memoria residente RM (CD103+ CD62L-) (G,H) y la cantidad de células T CD4+ y CD8+ de memoria efectora EM (CD103+ CD62L-) (I,J) (n=7; 2 experimentos independientes; diferencia significativa para una prueba Kruskal–Wallis **p < 0.05 * p < 0.1 con comparación múltiple de Dunn).

La inmunización con porinas de *S. Typhi* induce una respuesta funcional de células T CD4 + y CD8 + de memoria central

Para evaluar la presencia de células T de memoria central, se obtuvieron las células del GLD de la piel inmunizada de los ratones y se llevó a cabo el mismo análisis de datos que para las células T de la piel. En primer lugar, analizamos la presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ en el GLD de la piel (Figura 3A) y encontramos un aumento en el número total de linfocitos T CD4+ (Figura 3B), pero no ocurrió lo mismo en el número total de linfocitos T CD8+ del GLD, ya que no se obtuvo un incremento significativo con respecto a los grupos control (Figura 3C). Siguiendo la misma estrategia utilizada para analizar las células de la piel, evaluamos la funcionalidad y la especificidad de las células T del GLD de la piel inmunizada mediante el análisis de la expresión de IFN- γ e IL-17 (Figura 3D). Se observó un incremento significativo en el número total de linfocitos T CD4 + productores de IFN- γ (Figura 3E), mientras que un incremento similar se encontró en el número total de células T CD4+ productoras de IL-17 (Figura 3F). Al contrario de lo observado en la piel, la presencia de células T CD8+ funcionales fue claramente evidente, el número total de células T CD8+ productoras de IFN- γ fueron significativamente mayores en comparación con los controles (Figura 3G); se observó un hallazgo similar en el número total de células T CD8+ productoras de IL-17 (Figura 3H). Finalmente, evaluamos el fenotipo de memoria de células T específicas en el GLD de la piel inmunizada (Figura 3I), en donde se logró observar una presencia predominante de células T CD4+ (Figura 3J) y CD8+ (Figura 3K) de memoria central, mientras que esas células T de memoria estaban prácticamente ausentes en los grupos de control negativo. Por otro lado, no se encontró que las células T de memoria residente y

efectora se aumentarían para ninguna de las poblaciones de células T en el GLD de la piel inmunizada para ninguno de los grupos experimentales. Hasta este punto, se logró detectar la presencia de las diferentes subpoblaciones de células T de memoria residentes y circulantes después de la inmunización con porinas; a continuación, se buscará evaluar su papel en la protección contra el reto de *S. Typhi*.

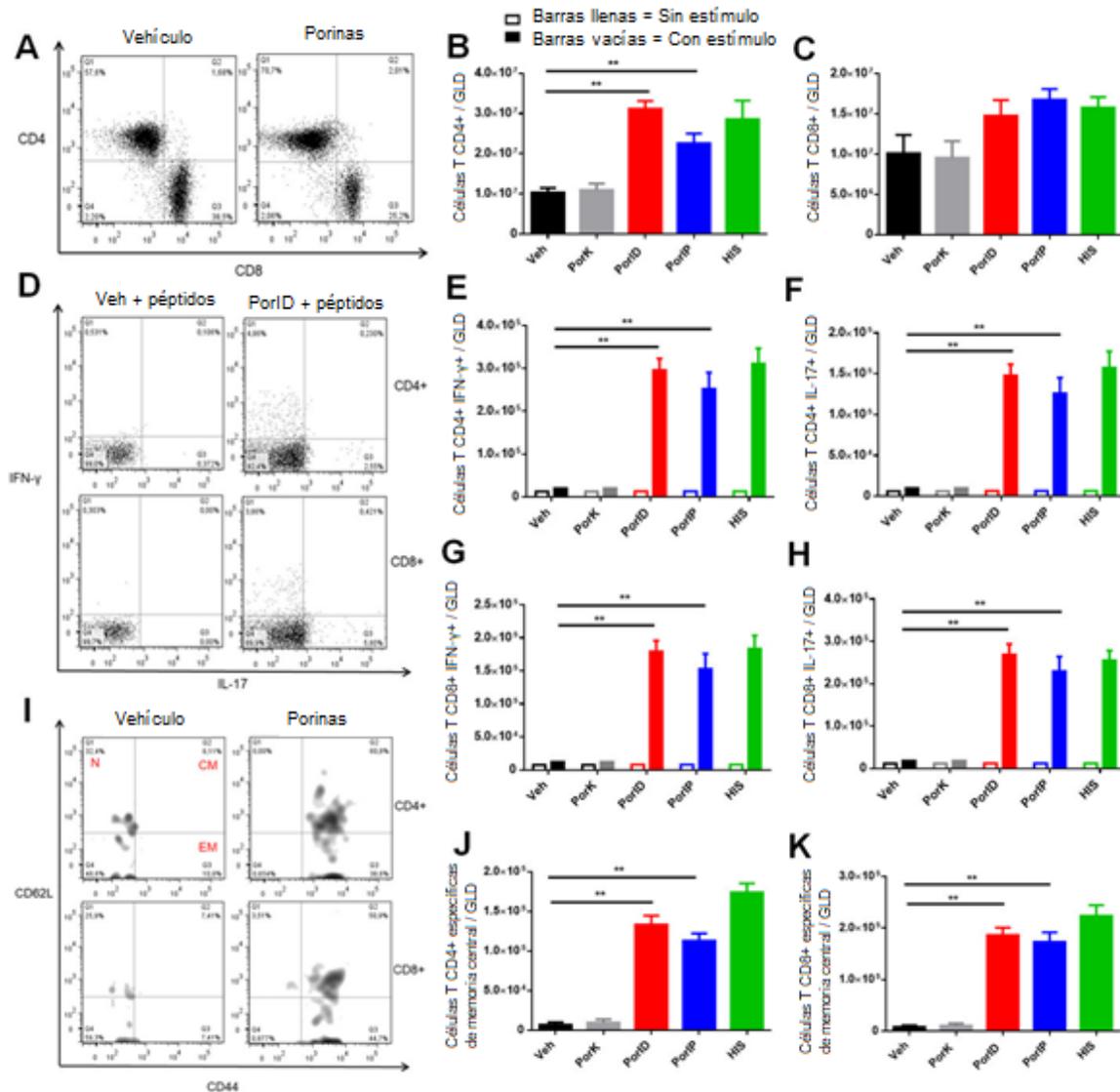


Figura 3. La inmunización con porinas de *S. Typhi* induce una respuesta funcional de células T CD4 + y CD8 + de memoria central. Ratones C57BL/6J fueron inmunizados intradérmicamente en la oreja con vehículo (Veh), porinas digeridas con proteinasa K (PorK) y porinas (PorID), intraperitonealmente con porinas (PorIP) o *S. Typhi* inactivada por calor (HIS) al día 0. Todos los grupos recibieron un refuerzo al día 14 con porinas vía intradérmica

en la oreja. Se extrajeron las células de ganglio linfático drenante de la piel inmunizada (GLD) y se hizo el conteo de las células T CD4+ y CD8+ totales (A-C). Se evaluó la producción de IFN- γ e IL-17 (D) como medida de la funcionalidad de las células T CD4+ (E,F) y CD8+ (G,H). A las células funcionales se les determinó su fenotipo de memoria mediante la expresión de CD44 y CD62L (I), evaluando la cantidad de células T CD4+ y CD8+ de memoria central CM (CD44+ CD62L+) (J,K) (n=7; 2 experimentos independientes; diferencia significativa para una prueba Kruskal–Wallis **p < 0.05 * p < 0.1 con comparación múltiple de Dunn).

La inmunización con porinas de *S. Typhi* reduce la carga bacteriana después del reto

Se ha demostrado que las porinas son protectoras cuando se administran por vía intraperitoneal, pero en este estudio, para evaluar el papel de las subpoblaciones de células T de memoria en la protección, era importante determinar si la administración de porinas a través de la piel también podía inducir protección y si pudiera ser igual o más inmunogénica que la vía intraperitoneal. La inmunización intradérmica con porinas (PorID) en un esquema de inmunización y refuerzo (Figura 4A) logró inducir títulos de anticuerpos IgM (Figura 4B) e IgG (Figura 4C) específicos contra porinas a niveles similares a la inmunización intraperitoneal (PorIP) o al grupo inmunizado con bacteria inactivada (HIS), y a niveles significativamente más altos en comparación con los controles negativos.

Después se evaluó si ambas vías de inmunización con porinas (PorID o PorIP) pueden controlar la carga bacteriana en el bazo (Figura 4D) y el hígado (Figura 4E), observándose que ambas vías de inmunización con las porinas dejan dichos órganos de la mayoría de los ratones inmunizados con porinas a niveles de carga bacteriana por debajo de nuestro límite de detección, similar a los niveles observados en ratones inmunizados con HIS. Por lo tanto, confirmamos que las rutas de inmunización que inducen subpoblaciones de células T de memoria son capaces de controlar la carga bacteriana después del reto con *S. Typhi*.

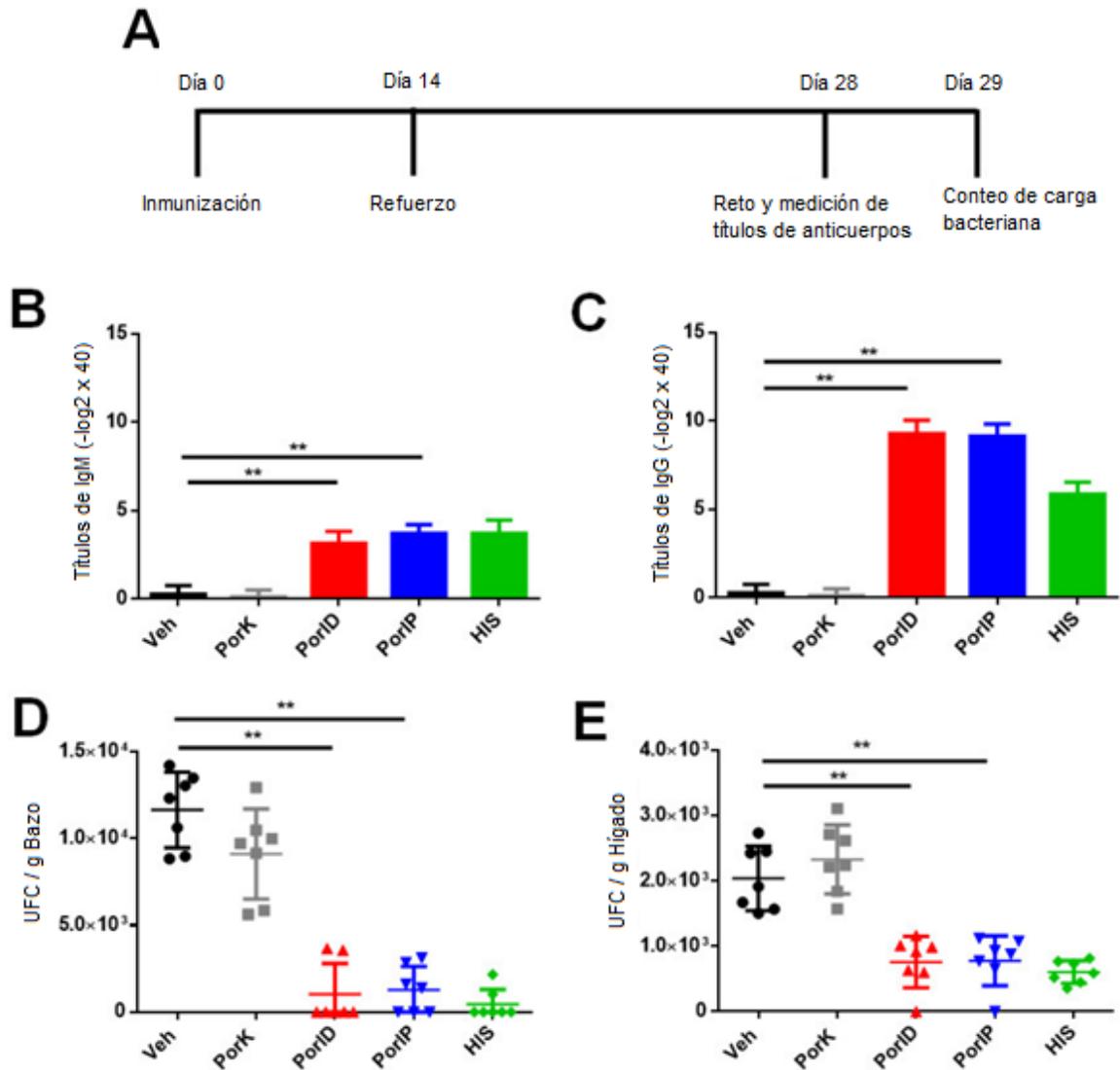


Figura 4. La inmunización con porinas de *S. Typhi* reduce la carga bacteriana después del reto. Ratones C57BL/6J fueron inmunizados intradérmicamente en la oreja con vehículo (Veh), porinas digeridas con proteinasa K (PorK) y porinas (PorID), intraperitonealmente con porinas (PorIP) o *S. Typhi* inactivada por calor (HIS) al día 0. Todos los grupos recibieron un refuerzo homólogo al día 14 (A). Al día 28 se midieron los títulos de anticuerpos séricos IgM (B) e IgG (C) contra porinas y todos los ratones se retaron con 10⁵ UFC de *S. Typhi*, 24 horas después del reto se evaluó la carga bacteriana en bazo (D) e hígado (E) (n=7; 3 experimentos independientes; diferencia significativa para una prueba Kruskal–Wallis **p < 0.05 * p < 0.1 con comparación múltiple de Dunn).

Las células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante son cruciales en la protección inducida por las porinas de *S. Typhi*

Finalmente, se decidió evaluar si las células T de memoria circulantes y residentes tienen una contribución relevante a la protección inducida por la inmunización con porinas. Para ello se desarrolló un modelo de eliminación de células T CD4+ y CD8+ mediante la administración intraperitoneal de los anticuerpos monoclonales GK1.5 (anti-CD4) y TIB-210 (anti-CD8) en ratones inmunizados con porinas al día 28 después de la primera inmunización (Figura 5A). Tras la eliminación de las células T CD4+ y CD8+, evaluamos si las células circulantes y/o células residentes de ambas estirpes de células T se lograban eliminar. El análisis por citometría de flujo del modelo de deleción arrojó que la eliminación de las células T de memoria se lograba sólo en la población circulante, mientras que las células T residentes de la piel no pudieron eliminarse (Figura 5B).

Posteriormente, evaluamos si la ausencia de las células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante tiene un impacto en la protección contra el reto con *S. Typhi* en ratones inmunizados con porinas. Los ratones deficientes de células T CD4+ y CD8+ que fueron inmunizados con porinas fueron retados con una dosis letal de *S. Typhi* y durante el experimento de eliminación se midieron los títulos de anticuerpos específicos contra porinas, con el fin de asegurar que el efecto visto en la protección se diera debido sólo a la ausencia de dichas poblaciones de células T. En primer lugar, observamos que las respuestas de anticuerpos IgM (Figura 5C) e IgG (Figura 5D) no se vieron afectadas por la eliminación de las poblaciones de células T CD4+ o CD8+ de memoria circulante, lo que confirma que pudimos evaluar el papel específico de la ausencia de las células T circulantes de memoria en el control del reto contra la bacteria.

De igual forma, se encontró que la ausencia de células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante dio como resultado un aumento significativo en la carga bacteriana en el bazo en comparación con los controles negativos (Figura 5E). Se observó un efecto

similar en el hígado, donde la ausencia de células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante aumentó el número de bacterias encontradas en este órgano (Figura 5F).

Finalmente, se reporta que la falta de células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante en los ratones vacunados con porinas tuvieron un efecto perjudicial importante en la protección contra el reto con *S. Typhi*. Se observó una disminución del 50% y del 80% en la supervivencia de los ratones deficientes de células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante, respectivamente, en comparación con los ratones vacunados que poseían ambas poblaciones de células T de memoria circulante (Figura 5G).

Las escalas clínicas asignadas durante el curso del reto también mostraron que la ausencia de células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante tuvo un impacto en el aumento de la severidad de los signos clínicos observados en esos grupos de ratones. Los ratones deficientes de dichas poblaciones celulares tuvieron puntuaciones clínicas más altas (mayor gravedad en los signos clínicos) en comparación con los ratones inmunizados que poseían sus poblaciones celulares completas (Figura 5H). Estos resultados finales proporcionan evidencia del papel crucial de las células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante en la protección frente a *S. Typhi* inducida por la inmunización con porinas.

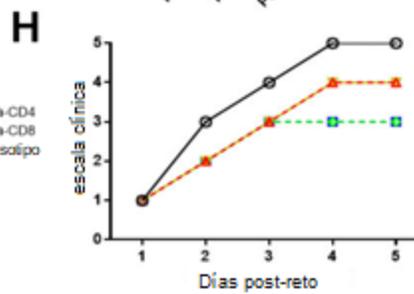
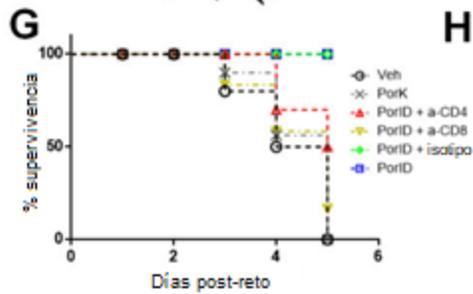
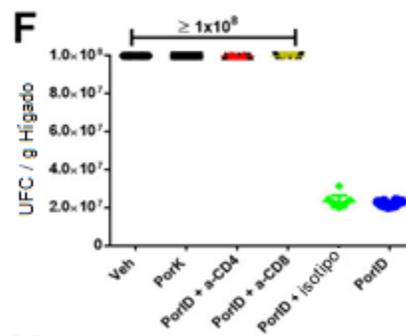
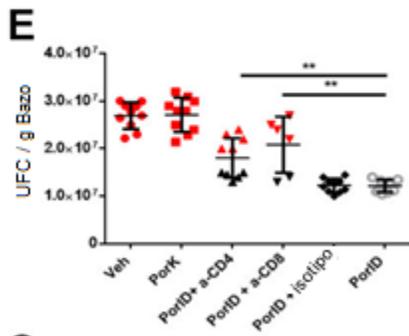
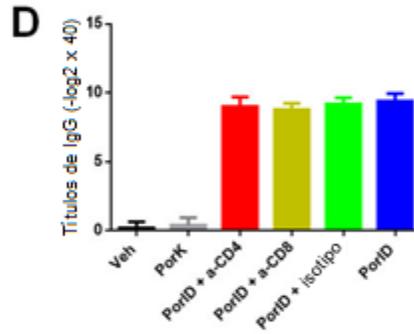
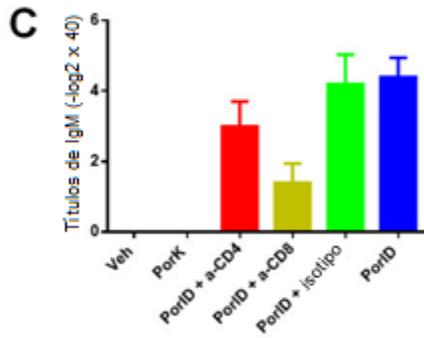
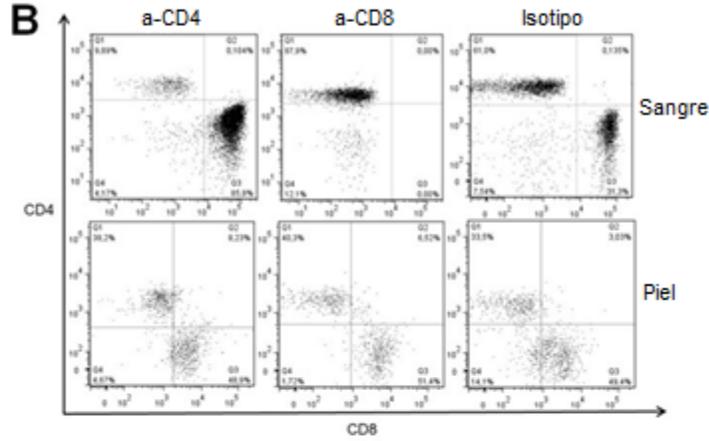
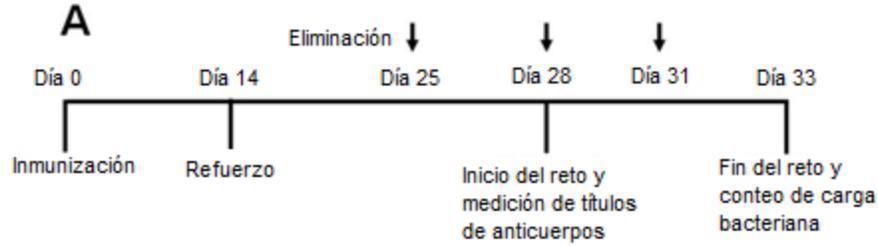


Figura 5. Las células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante son cruciales en la protección inducida por las porinas de S. Typhi. Ratones C57BL/6J fueron inmunizados intradérmicamente en la oreja con vehículo (Veh), porinas digeridas con proteinasa K (PorK) y porinas (PorID) al día 0. Todos los grupos recibieron un refuerzo homólogo al día 14 (A). Los ratones inmunizados con PorID se dividieron en 4 condiciones: anti-CD4 (a-CD4), anti-CD8 (a-CD8), control de isotipo y los ratones no tratados (PorID). Al día 25, 28 y 31 las células T CD4+ y CD8+ se eliminaron administrando los anticuerpos monoclonales GK1.5 y TIB-210 en los grupos a-CD4 y a-CD8, respectivamente (A,B). Al día 28 se midieron los títulos de anticuerpos séricos IgM (C) e IgG (D) contra porinas y todos los ratones se retaron con 10^8 UFC de S. Typhi por 5 días. Al término del reto se evaluó la carga bacteriana en bazo (E) e hígado (F) (los ratones que murieron durante el reto se representan en color negro). Finalmente se evaluó la supervivencia de los ratones (G) y su escala clínica (H) a lo largo del reto (n=10; 3 experimentos independientes; diferencia significativa para una prueba Kruskal–Wallis **p < 0.05 * p < 0.1 con comparación múltiple de Dunn).

IX.- DISCUSIÓN

Los mecanismos involucrados en la protección contra la infección por S. Typhi inducida por la inmunización con porinas aún no se comprenden completamente, los mecanismos ampliamente descritos involucraban la potente respuesta de anticuerpos bactericidas y la presencia de células T efectoras contra las porinas. Sin embargo, se desconocía la existencia de la respuesta de células T de memoria que la inmunización con porinas es capaz de inducir, el cual podría representar un componente importante en la protección contra la infección por S. Typhi. Por lo anterior, en el presente trabajo, evaluamos la inducción de las diferentes subpoblaciones de células T de memoria después de la inmunización con porinas, así como el papel de las células T de memoria circulantes en la protección mediada por porinas contra el reto con S. Typhi.

En este trabajo, se muestra que las porinas de S. Typhi indujeron una respuesta DTH específica contra sí mismas después de un régimen de inmunización y

refuerzo. Las proteínas de la membrana externa de *S. Typhi* se habían utilizado anteriormente en pruebas de DTH, sin embargo, sólo se había evaluado su papel como adyuvantes cuando se co-inmunizan con *Mycobacterium sp.* y no la inducción de una respuesta DTH contra sí mismas (Alurkar & Kamat, 1997). De igual forma, se describe un aumento en el número de células T CD4+ y CD8+ en el sitio inmunizado con porinas, lo cual concuerda con informes anteriores que correlacionan una prueba DTH positiva con un aumento de las células T en el sitio donde se realiza la prueba DTH (Belson et al., 2016).

Después, se observó la presencia de células T CD4+ y CD8+ funcionales y específicas en la piel inmunizada a través de la expresión de citocinas después de la estimulación específica para las porinas. Es importante mencionar que, aunque se encontraron células T CD4+ funcionales en la piel y en el GLD, las células T CD8+ funcionales se encontraron principalmente en GLD y no en la piel. De manera inicial, no se encontró incrementado el número de células T CD8+ en el GLD, probablemente por esa razón sólo un pequeño número de células T CD8+ funcionales lograron llegar a la piel y ser detectadas en el momento en que se realizó el estudio en este sitio.

El estudio de la respuesta de células T CD4+ y CD8+ funcionales y específicas contra las porinas en la piel, mostró que ambas poblaciones de células T expresaban a las citocinas IFN- γ o IL-17; sin embargo, diferentes patrones de expresión de IFN- γ e IL-17 se encontraron dependiendo del sitio analizado. Las células T del GLD de la piel fueron más propensas a expresar IFN- γ , lo cual concuerda con informes previamente descritos por nuestro grupo (Perez-Shibayama et al., 2014).

Por otro lado, aunque existen descripciones de la presencia de un perfil Th1 / Th17 después de la inmunización con proteínas bacterianas (Ferraro et al., 2019), en éste trabajo se encontró una población abundante que expresa IL-17 en piel. Este patrón en particular se puede explicar porque las células Th17 son una fuente importante

de células T residentes de memoria a largo plazo después de la inmunización, las cuales pueden responder inmediatamente contra patógenos bacterianos (Amezcuca Vesely et al., 2019).

La inmunización con porinas indujo la presencia de células T de memoria circulante y residente antígeno-específicas. Las poblaciones de células T CD4+ y CD8+ de memoria residente y efectora se encontraron en la piel, mientras que la presencia de células T CD4+ y CD8+ de memoria central fue evidente en el GLD de la piel inmunizada. La inducción de las tres subpoblaciones de células T de memoria por la inmunización con antígenos no adyuvantados no es un fenómeno comúnmente descrito; dicho fenómeno ha sido reportado principalmente para antígenos adyuvantados, y en esos casos la respuesta de las células T de memoria está principalmente dirigida a un perfil de células T de memoria circulante (Li Causi et al., 2015). En el caso particular de las porinas, demostramos que la inmunización con porinas de *S. Typhi* no sólo es capaz de inducir la subpoblación de memoria circulante, sino también células T de memoria residente, lo que podría deberse en parte a su capacidad adyuvante intrínseca. La inusual adyuvancia observada al inmunizar a las porinas, ha despertado el interés de usarlas como adyuvantes para otros antígenos de subunidades, microorganismos y como potencial terapia contra el cáncer (León-Letelier et al., 2020; Moreno-Eutimio et al., 2013; Pérez-Toledo et al., 2017).

En el caso de la protección contra *S. Typhi*, resultados de un modelo de parabiosis utilizando ratones inmunizados con la vacuna viva atenuada demostró que se requiere de la presencia de las células T de memoria circulante y no circulante (residentes de tejido) para lograr la protección óptima contra el reto con *S. Typhi* [23]. En el anterior trabajo, aunque la protección óptima se obtuvo en los ratones que poseían tanto células T circulantes como células T residentes, la presencia de solo el subconjunto circulante confirió protección parcial contra *S. Typhi*. Por esta razón, se requieren más estudios para dilucidar el papel exacto de la subpoblación de células T circulantes en la protección contra *S. Typhi*.

La caracterización del papel de las subpoblaciones de células T de memoria en la protección inducida por la inmunización con porinas es un paso crucial para comprender los mecanismos de protección contra *S. Typhi*. En este trabajo se demostró que la inmunización con porinas induce una fuerte respuesta protectora y de anticuerpos antígeno-específicos, y que se requiere la presencia de células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante para lograr una protección óptima contra el reto bacteriano. Dichas características inmunológicas no se han reportado ampliamente utilizando antígenos bacterianos purificados, aunque si son un hallazgo común en los estudios en los que se realiza la inmunización completa de bacterias u hongos (García-Lozano et al., 2018; Labuda & McSorley, 2020).

Es importante resaltar que, incluso cuando no todas las células T CD4+ circulantes lograron ser eliminadas usando dosis muy altas del anticuerpo GK1.5, nuestro modelo de eliminación nos permitió observar el efecto directo de la ausencia de células T de memoria circulantes en la protección mediada por las porinas, dado que los anticuerpos IgM e IgG específicos contra porinas con potencial actividad bactericida se mantuvo sin cambios en el momento en el que se inició el reto bacteriano. Además de que, la ausencia de las células T de memoria se indujo solo durante el tiempo en el que transcurrió el reto, momento en el que ya se había evidenciado la presencia de las distintas subpoblaciones de células T de memoria circulante en los experimentos anteriores.

Realizar una evaluación más precisa de la contribución de las células T de memoria residente en la protección permanece técnicamente desafiante, principalmente debido a la inaccesibilidad de los anticuerpos eliminadores para entrar a los tejidos deseados y a las dificultades para separar las células T residentes de tejido del resto de los componentes de respuesta inmune cuando se llevan a cabo experimentos de parabiosis o experimentos de eliminación. Por estas razones, numerosos estudios describen el papel protector de las células T de memoria residente dentro de todo el compartimento no circulante de la respuesta inmune (Han et al., 2017; Teijaro et

al., 2011). En el caso particular del presente proyecto, se fue capaz de evaluar el papel de la población de células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante en la protección mediada por las porinas, demostrando un papel crucial de estas células en el control de la diseminación bacteriana. Es importante mencionar también que en los ratones que carecían de células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante, la protección mediada por porinas no se perdió por completo, potencialmente debido a la presencia de anticuerpos bactericidas; sin embargo, dado que el compartimento de células T de memoria residente todavía permanecía presente, no podemos descartar un papel potencial de esta subpoblación celular en la protección contra el reto de *S. Typhi* y dicho papel debe investigarse más a fondo.

En conjunto, nuestros resultados mostraron que la inmunización con porinas de *S. Typhi* genera respuesta de células T CD4+ y CD8+ específicas y funcionales, las cuales poseen fenotipos de memoria circulante y de memoria residente, entre las que destaca la subpoblación circulante de células T de memoria CD4+ y CD8+ en la protección inducida por las porinas.

El hallazgo de la importancia que tiene la respuesta de las células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante en la protección contra *S. Typhi*, agrega una pieza al rompecabezas de los mecanismos de protección inducidos por las porinas, en el que se sabe que los anticuerpos desempeñan un papel clave. Esperamos que este trabajo contribuya a la comprensión y disección de los componentes de la respuesta inmunitaria implicados en protección y en los correlatos de protección contra la infección por *S. Typhi*.

X.- CONCLUSIÓN

En conjunto, nuestros resultados demuestran que la inmunización con porinas de *S. Typhi* genera una respuesta específica y funcional de células T CD4+ y CD8+ de memoria circulante y residente de tejido, sin embargo, las poblaciones de células T

CD4+ y CD8+ de memoria circulante resaltan por tener un papel crucial en la protección contra *S. Typhi* inducida por la inmunización con porinas.

XI.- PERSPECTIVAS

Se plantea continuar haciendo algunos ensayos para reforzar la importancia de las células T de memoria en la protección contra *S. Typhi*, entre los experimentos planeados se planea hacer una eliminación combinada con los anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 para analizar si existe un efecto sinérgico ante la ausencia de ambas poblaciones de células T circulantes. De igual forma se planea hacer una cinética en donde se identifiquen a las distintas subpoblaciones de células T de memoria desde el primer mes hasta el sexto mes post-inmunización, con el fin de conocer la duración de la respuesta celular de memoria inducida por las porinas. Finalmente, se desea hacer transferencias de las células T de memoria circulante y residente obtenidas de ratones inmunizados con porinas, en ratones vírgenes, a los cuales se les realizará un reto con *S. Typhi* para analizar de una manera más limpia la protección inducida por las células T de memoria.

XII.- BIBLIOGRAFIA

- Alurkar, V., & Kamat, R. (1997). Immunomodulatory properties of porins of some members of the family Enterobacteriaceae. *Infection and Immunity*, 65(6), 2382–2388. <https://doi.org/10.1128/iai.65.6.2382-2388.1997>
- Amezcu Vesely, M. C., Pallis, P., Bielecki, P., Esplugues, E., Gagliani, N., & Flavell, R. A. (2019). Effector TH17 Cells Give Rise to Long-Lived TRM Cells that Are Essential for an Immediate Response against Bacterial Infection. *Cell*, 178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.032>
- Antonio-Herrera, L., Badillo-Godinez, O., Medina-Contreras, O., Tepale-Segura, A., García-Lozano, A., Gutierrez-Xicotencatl, L., Soldevila, G., Esquivel-Guadarrama, F. R., Idoyaga, J., & Bonifaz, L. C. (2018). The Nontoxic Cholera B Subunit Is a Potent Adjuvant for Intradermal DC-Targeted Vaccination.

- Frontiers in Immunology*, 9, 2212. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02212>
- Belson, A., Schmidt, T., Fernando, D., Harges, K., Scott, N., Brett, S., Clark, D., Oliveira, J. J., Davis, B., McHugh, S., & Stone, J. (2016). Characterisation of the clinical and activated T cell response to repeat delayed-type hypersensitivity skin challenges in human subjects, with KLH and PPD, as a potential model to test T cell-targeted therapies. *Inflammation Research*, 65(5), 389–404. <https://doi.org/10.1007/s00011-016-0923-4>
- Benoun, J. M., Peres, N. G., Wang, N., Pham, O. H., Rudisill, V. L., Fogassy, Z. N., Whitney, P. G., Fernandez-Ruiz, D., Gebhardt, T., Pham, Q. M., Puddington, L., Bedoui, S., Strugnell, R. A., & McSorley, S. J. (2018). Optimal protection against Salmonella infection requires noncirculating memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(41), 10416–10421. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808339115>
- Beura, L. K., Wijeyesinghe, S., Thompson, E. A., Macchietto, M. G., Rosato, P. C., Pierson, M. J., Schenkel, J. M., Mitchell, J. S., Vezys, V., Fife, B. T., Shen, S., & Masopust, D. (2018). T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells. *Immunity*, 48(2), 327-338.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.015>
- Blanco, F., Isibasi, A., González, C. R., Ortiz, V., Paniagua, J., Arreguín, C., & Kumate, J. (1993). Human cell mediated immunity to porins from salmonella typhi. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 25(1), 73–80. <https://doi.org/10.1080/00365549309169673>
- Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G., & Smith, J. M. (2012). Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Current Protocols in Mouse Biology*, 2(2), 145–165. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110217>
- Carrenõ, J. M., Perez-Shibayama, C., Gil-Cruz, C., Lopez-Macias, C., Vernazza, P., Ludewig, B., & Albrich, W. C. (2017). Evolution of Salmonella Typhi outer membrane protein-specific T and B cell responses in humans following oral Ty21a vaccination: A randomized clinical trial. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178669>
- Di Meglio, P., Perera, G. K., & Nestle, F. O. (2011). The Multitasking Organ:

- Recent Insights into Skin Immune Function. In *Immunity* (Vol. 35, Issue 6, pp. 857–869). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.003>
- Díaz-Quiñonez, A., Martín-Orozco, N., Isibasi, A., & Ortiz-Navarrete, V. (2004). Two Salmonella OmpC Kb-Restricted Epitopes for CD8 +T-Cell Recognition. *Infection and Immunity*, *72*(5), 3059–3062. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.3059-3062.2004>
- Ferraro, A., Buonocore, S. M., Auquier, P., Nicolas, I., Wallemacq, H., Boutriau, D., & van der Most, R. G. (2019). Role and plasticity of Th1 and Th17 responses in immunity to *Staphylococcus aureus*. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *15*(12), 2980–2992. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1613126>
- García-Lozano, A., Toriello, C., Antonio-Herrera, L., & Bonifaz, L. C. (2018). *Sporothrix schenckii* Immunization, but Not Infection, Induces Protective Th17 Responses Mediated by Circulating Memory CD4+ T Cells. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUN), 1275. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01275>
- Gayet, R., Bioley, G., Rochereau, N., Paul, S., & Corthésy, B. (2017). Vaccination against Salmonella Infection: the Mucosal Way. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *81*(3). <https://doi.org/10.1128/mnbr.00007-17>
- Gray, J. I., Westerhof, L. M., & MacLeod, M. K. L. (2018). The roles of resident, central and effector memory CD4 T-cells in protective immunity following infection or vaccination. In *Immunology* (Vol. 154, Issue 4, pp. 574–581). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/imm.12929>
- Han, S. J., Glatman Zaretsky, A., Andrade-Oliveira, V., Collins, N., Dzutsev, A., Shaik, J., Morais da Fonseca, D., Harrison, O. J., Tamoutounour, S., Byrd, A. L., Smelkinson, M., Bouladoux, N., Bliska, J. B., Brenchley, J. M., Brodsky, I. E., & Belkaid, Y. (2017). White Adipose Tissue Is a Reservoir for Memory T Cells and Promotes Protective Memory Responses to Infection. *Immunity*, *47*(6), 1154-1168.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.009>
- Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., Gonzalez, C., Moreno, J., & Kumate, J. (1988). Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi*

- 9,12,d,Vi. *Infection and Immunity*, 56(11), 2953–2959.
<https://doi.org/10.1128/iai.56.11.2953-2959.1988>
- Isibasi, Armando, Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C. R., García, J. A., & Kumate, J. (1992). Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine*, 10(12), 811–813. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(92\)90041-H](https://doi.org/10.1016/0264-410X(92)90041-H)
- Jessica M. Healy, B. B. B. (2019). *Salmonellosis (Nontyphoidal) - Chapter 4 - 2020 Yellow Book | Travelers' Health | CDC*. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/salmonellosis-nontyphoidal>
- Labuda, J. C., & McSorley, S. J. (2020). Circulating memory is sufficient for protective immunity to infection with *Chlamydia muridarum*. *The Journal of Immunology*, 204(1 Supplement).
- León-Letelier, R. A., Castro-Medina, D. I., Badillo-Godinez, O., Tepale-Segura, A., Huanosta-Murillo, E., Aguilar-Flores, C., De León-Rodríguez, S. G., Mantilla, A., Fuentes-Pananá, E. M., López-Macías, C., & Bonifaz, L. C. (2020). Induction of Progenitor Exhausted Tissue-Resident Memory CD8+ T Cells Upon *Salmonella Typhi* Porins Adjuvant Immunization Correlates With Melanoma Control and Anti-PD-1 Immunotherapy Cooperation. *Frontiers in Immunology*, 11, 2893. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583382>
- Li Causi, E., Parikh, S. C., Chudley, L., Layfield, D. M., Ottensmeier, C. H., Stevenson, F. K., & Di Genova, G. (2015). Vaccination Expands Antigen-Specific CD4+ Memory T Cells and Mobilizes Bystander Central Memory T Cells. *PLOS ONE*, 10(9), e0136717.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136717>
- Moreno-Eutimio, M. A., Tenorio-Calvo, A., Pastelin-Palacios, R., Perez-Shibayama, C., Gil-Cruz, C., López-Santiago, R., Baeza, I., Fernández-Mora, M., Bonifaz, L., Isibasi, A., Calva, E., & López-Macías, C. (2013). *Salmonella Typhi* OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties. *Immunology*, 139(4), 459–471.
<https://doi.org/10.1111/imm.12093>

- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/membr.67.4.593-656.2003>
- Ortiz, V., Isibasi, A., Garcia-Ortigoza, E., & Kumate, J. (1989). Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(7), 1640–1645. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.7.1640-1645.1989>
- Padilla, M. L., Callister, S. M., Schell, R. F., Bryant, G. L., Jobe, D. A., Lovrich, S. D., Duchateau, B. K., & Jensen, J. R. (1996). *Characterization of the Protective Borrelia burgdorferi Antibody Response in Humans and Hamsters after Vaccination with a Borrelia burgdorferi Outer Surface Protein A Vaccine*. <https://academic.oup.com/jid/article/174/4/739/812931>
- Perez-Shibayama, C., Gil-Cruz, C., Pastelin-Palacios, R., Cervantes-Barragan, L., Hisaki, E., Chai, Q., Onder, L., Scandella, E., Regen, T., Waisman, A., Isibasi, A., Lopez-Macias, C., & Ludewig, B. (2014). IFN- γ -Producing CD4 + T Cells Promote Generation of Protective Germinal Center-Derived IgM + B Cell Memory against *Salmonella Typhi*. *The Journal of Immunology*, 192(11), 5192–5200. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302526>
- Pérez-Toledo, M., Valero-Pacheco, N., Pastelin-Palacios, R., Gil-Cruz, C., Perez-Shibayama, C., Moreno-Eutimio, M. A., Becker, I., Pérez-Tapia, S. M., Arriaga-Pizano, L., Cunningham, A. F., Isibasi, A., Bonifaz, L. C., & López-Macías, C. (2017). *Salmonella typhi* porins OmpC and OmpF are potent adjuvants for T-dependent and T-independent antigens. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00230>
- Salazar-González, R. M., Maldonado-Bernal, C., Ramírez-Cruz, N. E., Rios-Sarabia, N., Beltrán-Nava, J., Castañón-González, J., Castillo-Torres, N., Palma-Aguirre, J. A., Carrera-Camargo, M., López-Macías, C., & Isibasi, A. (2004). Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunology Letters*, 93(2–3),

115–122. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.01.010>

- Secundino, I., López-Macías, C., Cervantes-Barragán, L., Gil-Cruz, C., Ríos-Sarabia, N., Pastelin-Palacios, R., Villasis-Keever, M. A., Becker, I., Puente, J. L., Calva, E., & Isibasi, A. (2006). Salmonella porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology*, *117*(1), 59–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02263.x>
- Seder, R. A., & Ahmed, R. (2003). Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. In *Nature Immunology* (Vol. 4, Issue 9, pp. 835–842). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni969>
- Stanaway, J. D., Parisi, A., Sarkar, K., Blacker, B. F., Reiner, R. C., Hay, S. I., Nixon, M. R., Dolecek, C., James, S. L., Mokdad, A. H., Abebe, G., Ahmadian, E., Alahdab, F., Alemnew, B. T. T., Alipour, V., Allah Bakeshei, F., Animut, M. D., Ansari, F., Arabloo, J., ... Crump, J. A. (2019). The global burden of non-typhoidal salmonella invasive disease: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Infectious Diseases*, *19*(12), 1312–1324. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30418-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30418-9)
- Steinbach, K., Vincenti, I., & Merkler, D. (2018). Resident-Memory T Cells in tissue-restricted immune responses: For better or worse? In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue NOV, p. 2827). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02827>
- Szabo, P. A., Miron, M., & Farber, D. L. (2019). Location, location, location: Tissue resident memory T cells in mice and humans. In *Science Immunology* (Vol. 4, Issue 34, p. 9673). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aas9673>
- Teijaro, J. R., Turner, D., Pham, Q., Wherry, E. J., Lefrançois, L., & Farber, D. L. (2011). Cutting Edge: Tissue-Retentive Lung Memory CD4 T Cells Mediate Optimal Protection to Respiratory Virus Infection. *The Journal of Immunology*, *187*(11), 5510–5514. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102243>
- Valero-Pacheco, N., Blight, J., Aldapa-Vega, G., Kemlo, P., Pérez-Toledo, M., Wong-Baeza, I., Kurioka, A., Perez-Shibayama, C., Gil-Cruz, C., Sánchez-Torres, L. E., Pastelin-Palacios, R., Isibasi, A., Reyes-Sandoval, A.,

- Klenerman, P., & López-Macías, C. (2020). Conservation of the OmpC Porin Among Typhoidal and Non-Typhoidal Salmonella Serovars. *Frontiers in Immunology*, 10, 2966. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02966>
- Welte, W., Nestel, U., Wacker, T., & Diederichs, K. (1995). Structure and function of the porin channel. In *Kidney International* (Vol. 48).
- WHO. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. In *World Health Organization*. <https://doi.org/10.1590/S0100-15742013000100018>