



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Evaluación del potencial alergénico de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* en un modelo de alergia en ratones BALB/c

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

KARLA IVETTE SANTOS VIGIL

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LETICIA MORENO FIERROS, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

COMITÉ TUTOR

DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE, DEPARTAMENTO DE BIOMÉDICA
MOLECULAR, CINVESTAV

DR. ARMANDO PÉREZ TORRES, BIOLOGÍA CELULAR Y TISULAR, FACULTAD DE
MEDICINA



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.

Agradecimientos

- Mi entero agradecimiento al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)



- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de apoyo para la realización de mis estudios de Doctorado



- Esta tesis fue financiada por los proyectos:
- UNAM PAPIIT (IN219013, IN219416, IN223319, IN22331)
- UNAM PAPCA (2016-2018)
- CONACYT (CB177612, CB283319, CB283319)

Agradecimientos

A MI TUTORA

Dra. Leticia Moreno Fierros estaré eternamente agradecida con usted por haberme abierto las puertas de su laboratorio desde la licenciatura, enseñarnos desde cero, mostrarme lo maravilloso de la ciencia y más aún de la inmunología y sobre todo gracias porque tengo la fortuna de conocer el gran ejemplo de mujer e investigadora que usted es.

Gracias doctora por su incondicional apoyo durante todo el doctorado como tutora e impulsarme siempre a realizar un buen trabajo, gracias por creer en mí y en los resultados, por todo lo que he aprendido de usted, por sus consejos, recomendaciones, comprensión, apoyo personal y por la enorme paciencia que siempre tiene con sus alumnos y por los regaños cuando eran necesarios y que afortunadamente fueron muy pocos durante estos 8 años desde que llegue al laboratorio 9.

Nunca olvidare todo lo aprendido y sus consejos siempre acertados.

A mi comité tutorial

Dr. Vianney Ortiz Navarrete y Dr. Armando Pérez Torres por su apoyo durante todo el doctorado, por todo el tiempo y atención que me han brindado para la realización de este proyecto de investigación y en mi formación como investigador, gracias por siempre estar al pendiente, por sus consejos y observaciones sobre el proyecto que siempre fueron enriquecedores y objetivos. Gracias por dejarme conocerlos como profesores, tutores e investigadores, siempre estaré agradecida.

Y un especial agradecimiento al **Dr. Eduardo García Zepeda** quien desafortunadamente ya no se encuentra con nosotros pero que siempre estuvo al pendiente del proyecto y de mi desarrollo en el doctorado y por el gran ejemplo de investigador que nos dejó.

A la técnico académico del Laboratorio 9 de Inmunidad en Mucosas

M en C Damaris Ilhuicatzí Alvarado

Gracias por tu incondicional apoyo profesional en la realización de este proyecto, por siempre estar dispuesta ayudarnos en la realización de los experimentos, planeación y colaboración en este proyecto. Gracias por enseñarme tantas técnicas y siempre estar dispuesta a buscar más opciones y por tu ayuda para resolver las dificultades que se presentaron durante el proyecto.

Dedicatoria

A mis padres

Carlos y Guera Las palabras no me alcanzan para agradecerles por haberme dado la vida, por ser los padres que son, por darme y enseñarme todo lo que soy como persona.

Ustedes son la razón por la que estoy aquí, cerrando este ciclo y cumpliendo mi meta más grande que hasta ahora me había trazado en la vida; mi gran sueño que fue la realización del doctorado. Gracias por siempre estar incondicionalmente para mí y mis hermanos, por todos los valores que nos han inculcado, por tantas enseñanzas que nunca se acabaran y por esa fortaleza que tienen para cada día seguir adelante y no dejarse vencer y mantener esta hermosa familia, la mejor familia que la vida y ustedes pudieron haberme dado.

A ustedes gracias eternamente por no dejarme caer nunca, ni sola, por siempre confiar en mí, en mis capacidades y apoyarme a seguir adelante y recordarme que puedo lograr tanto como yo quiera. Gracias por toda la paciencia y el amor.

Este logro es por ustedes y para ustedes son mi principal motor para querer ser una persona de bien, trabajadora y preparada. Son lo mejor que me dio la vida, LOS AMO INFINITAMENTE.

A mis hermanos

Frida y Carlos doy gracias a la vida y a mis padres por haberme dado dos hermosos y grandes regalos y compañeros de vida, gracias por todo el tiempo compartido y por lo que siempre aprendo de ustedes, por su apoyo, amor, alegría y paciencia. Por ser mis cómplices y perdón por esas veces que estaba de tal humor que hasta con ustedes me desquitaba. Ustedes son mi más grande motor para ser una buena persona y profesionalista y buen ejemplo para ustedes, siempre estaré para ustedes. LOS AMO HERMANOS.

Rafael Nambo gracias por tu incondicional apoyo y por siempre estar detrás de mi sosteniéndome cuando sentía que me quebraba, por confiar en mí y siempre apoyarme a seguir adelante. Por compartir conmigo tu pasión por la ciencia y la investigación. Gracias por siempre estar para mí y ayudarme a resolver mis problemas, aconsejarme y echarme porras, gracias por esa alegría que le das a mi vida por retarme siempre a soñar con más y hacer más. Doy gracias a la vida y al destino que nos permitieron cruzarnos y conocernos en este camino. Gracias por convertirte en estos últimos años en parte esencial de mi vida, TE AMO.

A mi familia

A mis seres queridos, que han estado conmigo toda la vida, por todo su amor y consejos, por compartir conmigo sus vidas porque desde niña sé que estoy rodeada de personas con gran corazón y fuerza, que siempre me han extendido la mano, apoyado, aconsejado y ayudado en todo momento, porque sin ustedes tampoco sería la Karla que soy ahora.

A mis abuelos Marina Balvanera, Eleazar Santos y Lucila Gómez que amo y que no tengo más que agradecerle por su amor y apoyo incondicional por que me llena de alegría poder compartir este logro y día con ustedes.

A mis tíos Marina, Fernando, Norma, Mario, Diana, Alejandro y Antonio que siempre están al pendiente de mí, que son los mejores tíos que puedo tener y que siempre me han enseñado y brindado mucho amor.

A mis primos Diana, Toño, Omar, Regina, Jimena, Pau, Pato, Chacho, Andrea y Luis Antonio, primos hermanos por compartir infancia, juegos, aventuras, momentos, logros y lo que nos falta, a todos los amos.

Itzel Hernández mi amiga incondicional, porque la familia también se escoge, porque eres la familia y amiga que se estará siempre en mi vida y yo en la tuya. Por tu amistad en las buenas y las malas, por tantos momentos buenos y malos que hemos compartido desde la prepa, por tus consejos, terapia, porras y tanta alegría que siempre me brindas y por abrirme las puertas de tu casa y tu familia.

A mi abuelo Antonio Vigil y mi tío Eleazar Santos que ya no están con nosotros y que desde el cielo sé que siguen al pendiente de mí, por todo lo que pude compartir con ellos, por los grandes seres humanos que fueron y todo lo que me

enseñaron. Sé que estarán sonriéndome desde allá, siempre los llevare en mi corazón.

A mis amigos

Al Laboratorio 9 de inmunidad en mucosas porque más que un laboratorio, escuela y lugar de trabajo son para mí una segunda y bonita familia. A mis amigos y hermanitos de laboratorio **M en C Damaris**, amiga por todo tu apoyo y paciencia, **M en C Robert** por tantos momentos y experiencias que hemos compartido, **Dr. Nestor** por tu ayuda, compañerismo y tantos momentos de risas, **Dra. Marilu** por el gran ejemplo de mujer que eres y tu apoyo, **Dra. Ana Lilia** porque fue la primera persona que me enseñó e instruyó en el laboratorio, por todos tus consejos personales y académicos.

A mis compañeros y amigos, porque siempre estar en el laboratorio era una gran experiencia, por todos esos experimentos juntos, risas y apoyo que todos nos hemos brindado a **Itzelina** mi roomie de aventura, **Toñito, David, Mauricio, Ángel y Angie, Liz, Dany, Ernesto, Dr. Jorge** y los compañeros más jóvenes que se han integrado al laboratorio.

A todos, en el mejor laboratorio, por compartir, tiempo, experiencias y amor por la ciencia y porque estos lazos sean por muchos años más, gracias por dejarme conocerlos.

A mis compañeros y amigos de la carrera por que, aunque han pasado ya los años me han seguido brindando su apoyo incondicional y amistad.

“Después de todo, ¿qué es un científico entonces? Es un Hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede.”

Jacques Yves Cousteau

Índice

Abreviaturas.....	3
Abstract.....	5
Resumen.....	6
1.Introducción.....	7
Justificación.....	14
Hipótesis.....	14
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares.....	15
2. Materiales y métodos.....	16
2.1 Animales.....	16
2.2 Producción de la toxina Cry1Ac.....	16
2.3 Inmunizaciones.....	17
2.4 Evaluación de reacciones alérgicas.....	18
2.5 Inducción de anafilaxis.....	19
2.6 Obtención de suero y lavados intestinales.....	20
2.7 Determinación de anticuerpos específicos anti-OVA y anti-Cry1Ac.....	20
2.8 Cuantificación de citocinas y proteasa mMCP-1.....	21
2.9 Obtención de leucocitos de bazo, ganglio mesentérico y placas de Peyer.....	21
2.10 Obtención de células intraepiteliales y de lámina propia.....	22
2.11 Citometría de flujo.....	23
2.12 Análisis histológico.....	23
2.13 Ensayo de competencia de unión de OVA y Cry1Ac a la superficie celular de macrófagos.....	24
2.14 Análisis estadístico.....	24
3.Resultados.....	25
3.1 La toxina Cry1Ac es inmunogénica cuando es administrada por vía intra-gástrica.....	25
3.2 La toxina Cry1Ac tiene un ligero efecto adyuvante hacia OVA en el modelo de alergia intestinal.....	27
3.3 La administración de la toxina Cry1Ac provoca manifestaciones alérgicas.....	29
3.4 La toxina Cry1Ac compite con OVA en la unión a la superficie celular de macrófagos RAW264.	

.....	31
3.5 La administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac induce respuesta específica de IgE en suero	32
3.6 La administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac induce un perfil de citocinas mezclado	33
3.7 La toxina Cry1Ac aumenta significativamente la proporción de linfocitos B220 + IgE+ en células de bazo, ganglio linfático mesentérico y placas de Peyer	34
3.8 La administración de la toxina Cry1Ac incrementa el número de eosinófilos y granulocitos totales en intestino	37
3.9 La toxina Cry1Ac no induce aumento en los niveles mMCP-1 en suero	39
3.10 La administración intra-gástrica de Cry1Ac induce hiperplasia intestinal linfoide en colon	39
3.11 La toxina Cry1Ac es capaz de inducir anafilaxis solo por vía intravenosa	42
4. Discusión	45
5. Conclusión	51
6. Consideraciones	51
7. Referencias	52
Apéndice	59

Índice de figuras

Figura 1. Modo de acción de las proteínas Cry	8
Figure 2. Protocolo de sensibilización	17
Figure 3. Protocolo de inducción de anafilaxis	19
Figure 4. Efecto inmunogénico de la toxina Cry1Ac por vía intra-gástrica	26
Figure 5. La toxina Cry1Ac tiene un ligero efecto adyuvante hacia OVA caracterizado por IgG1 en suero	28
Figure 6. La administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac induce reacciones alérgicas y respuesta específica de IgE	30
Figure 7. La unión de OVA-FITC a macrófagos RAW264.7 es inhibida parcialmente por la preincubación de los macrófagos con un exceso de toxina Cry1Ac	31
Figure 8. La administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac induce un perfil mixto de citocinas	34
Figure 9. Incremento en la proporción de linfocitos B220+ IgE+ en células de bazo, ganglio mesentérico y placas de Peyer	36
Figure 10. Análisis de células Siglec-F+ en células de lámina propia, conteo de granulocitos en intestino y cuantificación de mMCP-1	38
Figure 11. La toxina Cry1Ac induce hiperplasia del tejido linfoide en intestino	40
Figure 12. El reto intravenoso con OVA o la toxina Cry1Ac induce anafilaxis	43
Figure 1 suplementaria. Diferencias de temperatura antes y posterior al reto por vía intra-gástrica en ratones BALB/c	59
Figure 2 suplementaria. Proporción de células B220 + IgE + en lámina propia de intestino	60

Índice de tablas

Tabla 1. Plantas genéticamente modificadas que expresan toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> producidas hasta 2004 _____	9
Tabla 2. Escala de signos de reacciones alérgicas _____	19
Tabla 3. Cambios histopatológicos registrados en intestino delgado e intestino grueso de ratones BALB/c. _____	41

Abreviaturas

ALP	Fosfatasa alcalina (del inglés alkaline phosphatase)
ANOVA	Análisis de varianza
APN	Aminopeptidasa-N (del inglés aminopeptidase-N)
BSA	Albumina de suero bovina (del inglés bovine serum albumin)
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CADR	Receptor tipo cadherina (del inglés cadherin-like receptor)
CeD	Enfermedad celiaca, del inglés celiac disease
CT	Toxina de Cólera (del inglés Cholera toxin)
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático indirecto (del inglés enzyme-linked immunosorbent assay)
FCS	Suero fetal de ternera (del inglés fetal bovine serum)
GM	Ganglio mesentérico
GMO	Organismos genéticamente modificados (del inglés genetically modified organism)
GPI	Glicosilfosfatidilo inositol anclado (del inglés glycosylphosphatidyl

	inositol)
H&E	Hematoxilina y Eosina
IBD	Enfermedad inflamatoria intestinal (del inglés inflammatory bowel disease)
ID	Intestino delgado
IG	Intestino grueso
MAbs	Anticuerpo monoclonal (del inglés monoclonal antibody)
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógenos (del inglés mitogen activated protein kinases)
mMCP-1	Proteasa-1 de células cebadas de ratón (del inglés mouse mast cell protease-1)
OVA	Ovoalbúmina
PBS	Buffer de fosfato-salino (del inglés phosphate-buffered saline)
PHMB	p-hidroxibenzoato de mercurio (inhibidor de proteasas)
PP	Placas de Peyer
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Memorial Institute

Abstract

Cry1Ac toxin, from *Bacillus thuringiensis*, is widely used as a biopesticide and expressed in genetically modified organism (GMO), plants used for human and animal consumption. Since Cry1Ac is also immunogenic and able to activate macrophages, it is crucial to thoroughly evaluate the immunological effects elicited after intra-gastric administration. The allergenic potential of purified Cry1Ac was assessed and compared with that induced in a murine model of food-allergy to ovalbumin (OVA), in which animals are sensitized with the adjuvant Cholera toxin (CT). Mice were weekly intragastrically administered with: i) vehicle phosphate-buffered saline (PBS), ii) OVA, iii) OVA plus CT iv) Cry1Ac or v) OVA plus Cry1Ac. Seven weeks after, mice were intragastrically challenged and allergic reactions along with diverse allergy related immunological parameters were evaluated at systemic and intestinal level. The groups immunized with, Cry1Ac, OVA/Cry1Ac or OVA/CT developed moderate allergic reactions, induced significant IgE response and increased frequencies of intestinal granulocytes, IgE+ eosinophils and IgE+ lymphocytes. These same groups also showed colonic lymphoid hyperplasia, notably in humans, this has been associated with food allergy and intestinal inflammation. Although the adjuvant and allergenic potential of CT were higher than the effects of Cry1Ac, the results show that applied intra-gastrically at 50 µg doses, Cry1Ac is immunogenic, moderately allergenic and able to provoke intestinal lymphoid hyperplasia. Moreover, Cry1Ac is also able to induce anaphylaxis, since when mice were intragastrically sensitized with increasing doses of Cry1Ac, with every dose tested, a significant drop in rectal temperature was recorded after intravenous challenge.

Resumen

La toxina Cry1Ac producida por la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), es utilizada como bioinsecticida (esporas) debido a su actividad insecticida, mientras que la toxina ha sido expresada en plantas genéticamente modificadas, principalmente cultivos de hortalizas comercializadas para consumo humano y animal. Nuestro grupo de investigación ha determinado que la toxina Cry1Ac es inmunogénica y capaz de activar macrófagos; por lo que consideramos crucial evaluar los efectos inmunológicos y el potencial alergénico que pudiera tener la administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac. El potencial alergénico de la toxina Cry1Ac se evaluó y comparó con el inducido por un modelo murino de alergia alimentaria hacia ovoalbúmina (OVA), utilizando como adyuvante la toxina de Cólera (CT). Ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad fueron inmunizados una vez por semana durante siete semanas por vía intra-gástrica con: i) buffer de fosfato-salina (PBS) (vehículo), ii) OVA, iii) OVA+CT (control positivo de alergia), iv) Cry1Ac o v) OVA+Cry1Ac. En la octava semana, los ratones recibieron un reto antigénico con (PBS, OVA o Cry1Ac) por vía intra-gástrica e inmediatamente después se evaluaron las reacciones alérgicas; una hora más tarde los ratones fueron sacrificados para la evaluación de diversos parámetros inmunológicos relacionados con la alergia a nivel sistémico e intestinal. Los grupos inmunizados con Cry1Ac, OVA+Cry1Ac y OVA+CT desarrollaron reacciones alérgicas moderadas, indujeron respuestas significativas de IgE, aumentaron el número de granulocitos en intestino y linfocitos IgE+ en células de bazo, ganglio mesentérico y placas de Peyer. Estos mismos grupos, mostraron hiperplasia del tejido linfoide en colon, la cual; en humanos, ha sido asociada con alergia a los alimentos e inflamación intestinal. Aunque el potencial adyuvante y alergénico de la CT fue mayor que el observado con la toxina Cry1Ac. Nuestros resultados demuestran que la toxina Cry1Ac cuando es administrada por vía intra-gástrica es inmunogénica y moderadamente alergénica en comparación con el potencial efecto alergénico observado de la CT; debido a que la toxina Cry1Ac fue capaz de inducir anafilaxis observada en el descenso de la temperatura cuando los ratones recibieron el reto antigénico por vía intravenosa y capaz de provocar hiperplasia linfoide intestinal; se recomienda llevar a cabo más estudios sobre la evaluación del potencial alergénico de plantas genéticamente modificadas que expresan la toxina Cry y que en la actualidad son comercializadas y consumidas por animales y humanos, considerando el análisis de la mucosa intestinal.

1.Introducción

Las proteínas Cry son producidas por la bacteria Gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt) como δ -endotoxina durante la fase de esporulación en forma de cristales. Estas proteínas tienen alta solubilidad, son estables a pH alcalino y tienen resistencia a la proteólisis. Su principal uso ha sido como bioinsecticida debido a su perfil tóxico frente a larvas de insectos de los órdenes Lepidoptera, Diptera y Coleoptera [1].

El mecanismo de acción de las proteínas Cry como bioinsecticida ha sido caracterizado en insectos. Los cuerpos paraesporales en forma de cristales que contienen a la protoxina Cry son ingeridos por las larvas insectos blanco cuando se encuentran en el estadio de larva, una vez ingeridas, son solubilizadas debido al pH altamente alcalino presente en el intestino medio de la larva de insecto, para posteriormente ser activadas proteolíticamente por proteasas como la tripsina formando el fragmento tóxico de 65-70 kDa. Una vez activada la toxina, ésta se une a receptores específicos presentes en el borde apical del epitelio intestinal de la larva; en lepidópteros por ejemplo se ha determinado que la toxina se une a receptores de tipo cadherina (CADR), glicosilfosfatidilo inositol anclado (GPI), aminopeptidasa-N (APN), fosfatasa alcalina (ALP), el glicoconjugado de 270kDa y la proteína llamada P252 de 250-kDa que provoca la formación de un poro lítico, induciendo respuestas celulares complejas que alteran la integridad celular provocando cambios y diferencias en el potencial transepitelial, conduciendo finalmente a lisis celular y la muerte de la larva [2–5] (Fig. 1).

Las proteínas Cry han sido consideradas no tóxicas para vertebrados, incluyendo al humano, ya que carecen de efectos nocivos sobre estos, además de tener bajo impacto en insectos no blanco y alta eficiencia en el control de plagas en cultivos de hortalizas y cereales principalmente. En la actualidad han sido producidas y comercializadas plantas genéticamente modificadas que

expresan la toxina Cry como un medio altamente efectivo en el control de plagas, por lo que existe una gran variedad de plantas transgénicas que expresan toxinas Cry, mejor conocidas como plantas Bt que han sido producidas y comercializadas en distintos países, las cuales pueden expresar una diferentes o varias toxinas Cry de Bt. [2].

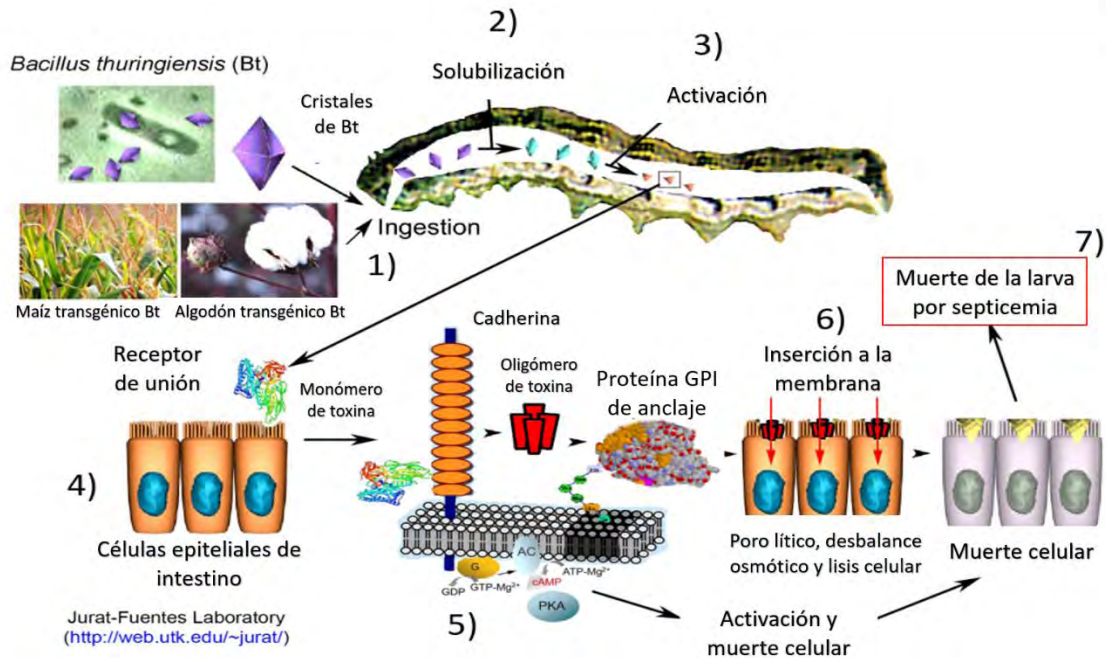


Figura 1. Modo de acción de las proteínas Cry. Ingesta de la proteína Cry por insectos susceptibles; 2) las proteínas Cry son solubilizadas en el intestino del insecto por pH altamente alcalino; 3) procesamiento proteolítico de la protoxina Cry por enzimas (como tripsina) presentes en el intestino medio y que activan a la toxina; 4) la toxina en forma de monómero viaja a través de la matriz peritrófica del intestino; 5) unión a receptores específicos en el borde de cepillo de las células epiteliales del intestino de la larva a cadherinas activando la formación de oligómeros de la toxina que se une a la proteína Glicosilfosfatidilo inositol anclado (GPI) en las balsas lipídicas entre otras proteínas; 6) inserción del complejo a la membrana y formación del poro lítico, lo que provoca ; 7) el choque celular osmótico que finaliza con la muerte del insecto [6].

Desde la introducción de la primera planta desarrollada genéticamente modificada que expresaba la toxina Cry de Bt en maíz en 1996 ha ido a la alza a nivel global la producción y comercialización de maíz transgénico de Bt, el cual

hasta el 2014 ocupaba un área de 181.5 millones de hectáreas plantadas en 28 países de acuerdo a la ISAAA (International Service for the Acquisition Agri-biotech Applications); mientras que el segundo cultivo más plantado de plantas transgénicas de Bt fue la soya hasta el 2011; sin embargo, en maíz existen diferentes plantas transgénicas de Bt que expresan diferentes toxinas Cry que han sido aprobadas para su uso comercial y consumo por animales y humanos además de la comercialización de otros cultivos de hortalizas que expresan las toxinas Cry como se puede ver en la Tabla 1.

Tabla 1. Plantas genéticamente modificadas que expresan toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* producidas hasta 2004.

Protein/crop	Developer	Product
Eggplant (<i>Solanum melongena</i>) Cry1Ac	Maharashtra Hybrid Seed Company (MAHYCO)	BARI Bt Begun-1, -2, -3 and -4
Potato (<i>Solanum tuberosum</i> L) Cry3A	Centre Biengineering, Russian Academy of Sciences	Lugovskoi plus, Elizaveta plus, Atlantic NewLeaf™ potato, Atlantic NewLeaf™ potato, Atlantic NewLeaf™ potato
Cry3A	Monsanto Company	New Leaf™ Russet Burbank potato, Hi-Lite NewLeaf™ Y potato, Shepody NewLeaf™ Y potato, Superior NewLeaf™ potato
Rice (<i>Oryza sativa</i> L) CryAc, Cry1Ab	Huazhong Agricultural University (China)	BT Shanyou 63
CryAc, Cry1Ab	Huazhong Agricultural University (China)	Huahui-1
Soybean (<i>Glycine max</i> L) Cry1Ac	Monsanto Company	Intacta™ Roundup Ready™ 2 Pro
Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i>) Cry1Ac	Monsanto Company	—
Maize (<i>Zea mays</i> L) eCry3.1Ab eCry3.1Ab, mCry3A, Cry1Ab, Cry1Fa2	Syngenta Syngenta	Agrisure™ Duracade™ Agrisure™ Duracade™ 5122 Agrisure™ Duracade™ 5222 Agrisure™ GT/CB/LL
Cry1Ab	Syngenta	Bt10, Agrisure™ CB/LL, Agrisure™ Viptera™ 3110, NaturGard KnockOut™, Maximizer™ Agrisure™ 3122
Cry34Ab1, Cry35Ab1, mCry3A, Cry1Ab, Cry1Fa2 Cry1Ab (truncated) mCry3A, Cry1Ab,	Syngenta Syngenta	Agrisure™ Viptera™ 2100 Agrisure™ Viptera™ 3111, Agrisure™ Viptera™ 4, Agrisure™ Viptera™ 3100, Agrisure™ CB/LL/RW, Agrisure™ 3000GT, Agrisure™ RW, Agrisure™ GT/RW
Cry1Ab, Cry1Fa2 Cry9C Cry34Ab1 Cry35Ab1	Syngenta Bayer CropScience Dow AgroSciences LLC and DuPont	Agrisure™ Viptera 3220 Starlink™ Maize Herculex™ RW
Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry34Ab1, Cry1Ab, mCry3A Cry1Fa2, Cry34Ab1, Cry35Ab1 Cry1Fa2, mCry3A Cry1Fa2	DuPont (Pioneer Hi-Bred International Inc.) DuPont Dow AgroSciences LLC and DuPont	Herculex™ RW Roundup Ready™ 2 Optimum™ Intrasect Xtreme Herculex XTRA™ RR
Cry1Ab	Dow AgroSciences LLC and DuPont Monsanto Company	Optimum™ TRlsect Herculex™ I RR Roundup Ready™ YieldGard™ maize, YieldGard™, MaizeGard™, YieldGard™ VT Triple, YieldGard™ CB + RR, Liberty Link™ Yieldgard™ Maize
Cry1Ac	Monsanto Company	Bt Xtra™ Maize

Table 1. (Continued)		
Protein/crop	Developer	Product
Cry1Ab	Renesse LLC (Netherlands) and Monsanto Company	Mavera™ YieldGard™ Maize
Cry3Bb1	Monsanto Company	YieldGard™ Rootworm RW, MaxGard™
Cry3Bb1, Cry1Ab	Monsanto Company	YieldGard™ Plus YieldGard™ Plus with RR
Cry3Bb1	Monsanto Company	YieldGard™ VT™ Rootworm™ RR2, YieldGard™ RW + RR
Cry2Ab2, Cry1A.105	Monsanto Company	YieldGard™ VT Pro™
Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1	Monsanto Company	Genuity® VT Triple Pro™
Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1A.105, Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry2Ab2, Cry1Fa2	Monsanto Company	Genuity® VT Double Pro™ Genuity® SmartStax™
Cry2Ab2, Cry1Fa2, cry1A.105, Cry1Fa2,	Monsanto Company	Power Core™
	Monsanto Company	Herculex™ I, Herculex™ CB

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). GMO Approval Database for insect resistance 2015.

La tabla muestra la gran variedad de plantas genéticamente modificadas que expresan diferentes toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* que han sido producidas por diferentes compañías. (Tabla tomada de Rubio-Infante & Moreno-Fierros, 2015) [4].

Han sido realizados distintos estudios toxicológicos en animales de laboratorio en los que se han evaluado las plantas de Bt; estos análisis han incluido pruebas de laboratorio tales como, química sanguínea, peso corporal y de los órganos, análisis patológico incluyendo la presencia de tumores. La mayoría de estos estudios han concluido que el consumo de plantas de Bt son seguras para consumo humano y animal basado principalmente en la falta de anomalías en los parámetros evaluados y falta de toxicidad o muerte asociada al consumo de las proteínas Cry [7–13]. Sin embargo, aún existe gran preocupación y controversia alrededor las seguridad de las plantas de Bt y si están pueden constituir un riesgo para la salud a largo plazo debido al aumento significativo en la incidencia de alergia y enfermedades inflamatorias intestinales en las últimas décadas, principalmente en países industrializados [1]. Considerando las propiedades inmunológicas de la proteína Cry1Ac, como inmunogenicidad, efecto adyuvante sistémico y en mucosas [14–21], así como su capacidad de activar macrófagos [22,23]; se ha sido sugerido el posible potencial alergénico o capacidad para poder inducir respuestas inflamatorias, específicamente la proteína Cry1Ac estudiada por nuestro grupo de investigación [4]. Por lo que

consideramos necesario la evaluación *in vivo* de los efectos inmunológicos de esta proteína en mamíferos que pudiera traer como consecuencia el consumo de plantas genéticamente modificadas de Bt por vertebrados (animales de crianza y humanos).

Nuestro grupo de investigación ha determinado que la proteína Cry1Ac es un potente inmunógeno, mientras que la protoxina tiene efecto adyuvante sistémico y de mucosas tan potente como el adyuvante toxina de Cólera (CT) [15,24]; demostrando además, que como adyuvante, la protoxina Cry1Ac confiere mayor protección en varios modelos de infección en murinos [14,15,20,21,25]. Es importante destacar que recientemente hemos demostrado que la protoxina y la toxina Cry1Ac son capaces de activar macrófagos e inducir la activación de vías de señalización como las MAPKS [22,26]. En consecuencia, estos hallazgos refuerzan la necesidad de realizar una evaluación más profunda para determinar si las plantas genéticamente modificadas de Bt pueden constituir un riesgo para la salud.

Existen pocos estudios en los que se ha evaluado la inmunogenicidad y el potencial alergénico de las plantas genéticamente modificadas de Bt tras su administración por vía intra-gástrica. Estos estudios se han centrado en la evaluación de la toxina Cry1Ab (proteína homóloga en estructura a la proteína Cry1Ac en un 78% a 96%), tanto la toxina Cry1Ab purificada y expresada en maíz transgénico MON810. Algunos de estos estudios han determinado la inmunogenicidad de la toxina Cry1Ab mas no su alergenicidad; como en el estudio de Adel-Patient et al. [7] realizado en ratones BALB/c, en el cual, se encontró que la toxina purificada y el maíz MON810 que expresa la toxina Cry1Ab inducen respuesta específica de anticuerpos IgG e IgA en suero cuando fue administrada por vía intraperitoneal; sin embargo, no observaron respuesta significativa de IgE ni incremento de anticuerpos específicos cuando fue administrada por vía intra-gástrica [7].

Mientras que en un estudio reciente realizado por Andreassen [27], no observaron evidencia de la inmunogenicidad o alergenidad de Cry1Ab cuando fue administrada por vía intra-gástrica utilizando modelo de alergia que consistió en varias administraciones intra-gástricas de dosis bajas de la toxina Cry1Ab (10 µg) y un reto antigénico por vía intraperitoneal. Sin embargo, en este estudio no se realizó la evaluación de la respuesta inmune intestinal.

La alergia alimentaria se describe como una respuesta inmunológica adversa hacia proteínas de la dieta, caracterizada por la falta de tolerancia oral hacia proteínas de la dieta (inocuas), dejando como consecuencia, la producción de respuestas inmune celulares y humorales exacerbadas que traen como consecuencia el desarrollo de signos y síntomas de reactividad o reacciones de hipersensibilidad. La alergia puede ser categoriza como un desorden mediado por la producción de IgE o independiente a la producción de IgE. La respuesta mediada por la producción de anticuerpo IgE son las más reconocidas en la alergia por alimentos [28,29].

Durante la sensibilización inicial con proteínas de la dieta, estas estimulan la producción de anticuerpos específicos de IgE, que tiene alta afinidad a unirse a la superficie de células granulocitos como las cebadas, eosinófilos y basófilos a través del receptor FcεRI y ante una segunda exposición a la proteína, ésta tiene la capacidad de unirse los anticuerpos IgE específicos producidos que se encuentran unidos a los granulocitos, provocando la activación de los mismos liberando mediadores como histamina, prostaglandinas y leucotrienos, provocando las manifestaciones clínicas de la alergia las cuales ocurren típicamente dentro de las primeras dos horas de exposición al alérgeno que envuelven reacciones en la piel, tracto gastrointestinal, tracto respiratorio y la manifestación más severa que puede llegar a ocurrir que es la anafilaxis, que se refiere a una respuesta sistémica que puede incluir colapso cardiovascular y comprometer la vida [30–32].

En la actualidad han sido desarrollados diversos modelos animales de alergia alimentaria, que en general requieren el uso de un antígeno ante el cual se quiere producir sensibilización, sin embargo, para romper la tolerancia oral hacia el antígeno y que este sea capaz de producir sensibilización a nivel intestinal, los investigadores han desarrollado y utilizado dos tipos principales de modelos de alergia alimentaria en ratón. El primero es llevar a cabo la sensibilización hacia el antígeno por vía sistémica más el uso de un adyuvante como el (hidróxido de aluminio o el adyuvante completo de Freud) seguido de repetidos retos con el antígeno por vía oral, lo cual no se acerca a la sensibilización real que ocurre en la alergia alimentaria hacia proteínas de la dieta, ya que ésta se da a través de la ingesta de la comida por vía oral; mientras que la segunda alternativa consiste en realizar repetidas administraciones con antígeno más el uso de un ayudante mucosal como la toxina de Cólera (CT) que incluye la administración de altas dosis del antígeno así como reto o retos con antigénico por vía oral con el fin de romper la tolerancia oral e inducir sensibilización hacia el antígeno; como ejemplo el modelo estandarizado por Perrier [33], en cual usando CT como adyuvante y ovoalbúmina (OVA) como antígeno en ratones BALB/c con repetidas inmunizaciones y reto antigénicos por vía oral permitió a los autores inducir y comparar la respuestas inmunes sistémicas y en la mucosa intestinal [33–35].

Justificación

Debido a al desarrollo y comercialización de cultivos de hortalizas genéticamente modificadas que expresan la toxina Cy de *Bacillus thuringiensis* como proteína insecticida y al incremento del consumo de estas plantas por animales de crianza y humanos, teniendo en cuenta las propiedades inmunológicas que se han sido determinadas de la proteína Cry1Ac como, inmunogenicidad, su capacidad de activar macrófagos y vías de señalización como las MAPKs, consideramos necesario realizar estudios en los que se evalué si la administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac pudiera tener potencial alergénico y/o inducir respuestas inmunes intestinales adversas por el consumo de estas proteínas.

Hipótesis

La administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac favorece el desarrollo de respuestas inmunológicas relacionadas con la alergia.

Objetivo general

Determinar si la administración por vía intra-gástrica de la toxina Cry1Ac pudiera favorecer el desarrollo de respuestas inmunológicas intestinales relacionadas con la alergia en un modelo murino

Objetivos particulares

- Evaluar la inmunogenicidad y efecto adyuvante de la administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac
- Determinar el potencial alergénico de la toxina Cry1Ac por vía intra-gástrica
- Analizar si la administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac pudiera inducir cambios histopatológicos en tejido intestinal
- Evaluar si la toxina Cry1Ac es capaz de inducir anafilaxis

2. Materiales y métodos

2.1 Animales

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de (6-8 semanas de edad), que recibieron alimentación estéril (2019 Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet, Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN) y agua *ad libitum*. Los ratones fueron proporcionados por el bioterio de la FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México que cuenta con la aprobación de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción y uso de los animales de laboratorio.

2.2 Producción de la toxina Cry1Ac

La protoxina recombinante Cry1Ac se purificó a partir de cultivos de *E. coli* JM103 (Pos900) inducidos por IPTG como se describió previamente [36]. La protoxina fue solubilizada y digerida con tripsina para la obtención de la toxina descrito previamente [21]. Posteriormente, los niveles de endotoxina de la toxina Cry1Ac fueron determinados mediante el kit E-toxate de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.), los cuales estuvieron por debajo de 0,1 EU / mL. La toxina fue tratada con una resina de polimixina (Bio-Rad, Hercules CA, USA) para eliminar cualquier resto posible de endotoxina. La digestión de la proteína fue corroborada mediante un gel SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras.

2.3 Inmunizaciones

El protocolo de sensibilización utilizado se basó en un modelo de alergia alimentaria estandarizado por [33]; el cual consistió en administraciones por vía intra-gástrica una vez por semana durante siete semanas utilizando como antígeno la ovoalbúmina (OVA). En este modelo, como en la mayoría de los modelos de alergia por vía oral es necesaria la administración de altas dosis de antígeno para romper la tolerancia oral más el uso de un adyuvante como la toxina de Cólera (CT), por lo que dos dosis de antígeno en este caso OVA fueron utilizadas (50 μ g y 5 mg).

Los grupos fueron los siguientes: i) vehículo, buffer fosfato salino (PBS), ii) control negativo, ratones tolerizados con OVA (50 μ g o 5 mg) sola, iii) OVA (50 μ g o 5 mg) + Cry1Ac (50 μ g), iv) Cry1Ac (50 μ g) y v) control positivo de alergia OVA (50 μ g o 5mg) + toxina de Cólera (CT) (10 μ g) (Fig. 2b). Los ratones fueron administrados intragástricamente usando una (sonda) con volumen final de 200 μ L. En el día 49, los ratones recibieron un reto antigénico por vía intra-gástrica de 300 μ g de OVA para los grupos inmunizados con 50 μ g y de 20 mg de OVA para los grupos inmunizados con 5 mg de OVA, mientras que los grupos inmunizados con la toxina Cry1Ac (OVA/Cry1Ac y Cry1Ac) recibieron 300 μ g de Cry1Ac. Los ratones fueron sacrificados una hora después del reto antigénico por vía intra-gástrica mediante sobredosis de anestesia (Fig. 2a).

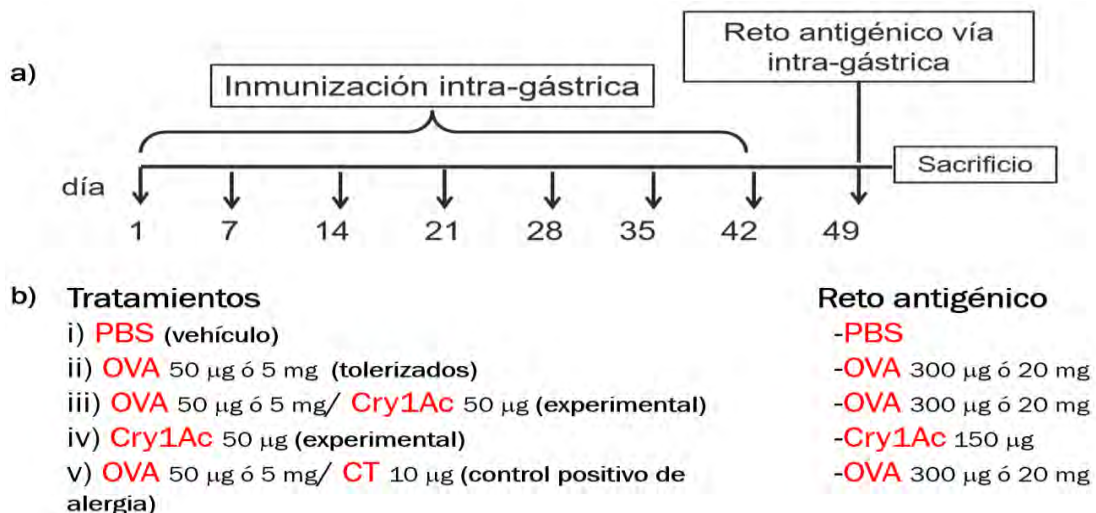


Figura 2. Protocolo de sensibilización. Ratones BALB/c hembras fueron inmunizados por vía intra-gástrica con: PBS (vehículo), OVA (tolerizados), OVA + CT (control positivo de alergia), OVA + Cry1Ac y Cry1Ac sola, (a) una vez por semana durante 7 semanas los días 1,7, 14, 21, 28, 35, 42; en la octava semana el día 49 los ratones recibieron un reto antigénico por vía intra-gástrica, fueran evaluadas las manifestaciones alérgicas y 1 hr después fueron sacrificados.

2.4 Evaluación de reacciones alérgicas

Los signos de reacción alérgica se evaluaron inmediatamente después del reto antigénico durante 15 minutos, analizado por dos investigaciones independientes. Las puntuaciones alérgicas se clasificaron posteriormente siguiendo una escala pre-establecida de 0 a 5 (Tabla 2) [33], que consistió en los siguientes signos: 0- sin signos; 1- los ratones se rascaron alrededor de la nariz, las orejas y la cabeza menos de 10 veces durante 15 minutos; 2- los ratones se rascaron 10 veces durante 15 min; 3- los ratones se rascaron más de 10 veces, se observó hinchazón alrededor de los ojos y la boca, diarrea, erizamiento de la piel durante 15 min; 4- los ratones presentaron disminución de la actividad y / o aumento de la frecuencia respiratoria; 5- muerte. La temperatura rectal fue registrada 30 min antes y 30 min después del reto antigénico usando un termómetro de sonda rectal.

Tabla 2. Escala de signos de reacciones alérgicas.

Puntuación	Signos
	Medición de temperatura rectal 30 min antes y 30 min después
0	Sin signos
1	Se rascan la nariz, orejas, boca y cuerpo de 3 a 6 veces durante 15 min
2	Se rascan la nariz, orejas, boca y cuerpo de 7 a 10 veces durante 15 min
3	Se rascan la nariz, orejas, boca y cuerpo más de 10 veces durante 15 min, hinchazón alrededor de ojos y boca, diarrea, erizamiento de la piel
4	Disminución de la actividad, dificultad para respirar o caminar
5	Manifestaciones del número 4 pero más graves, la muerte

2.5 Inducción de anafilaxis

Para evaluar si la toxina Cry1Ac es capaz de inducir anafilaxis, ratones adicionales fueron inmunizados como se describe en la sección de inmunizaciones y en el día 48 los ratones recibieron el reto antigénico por vía intra-gástrica y un día después recibieron un reto intravenoso con: 100 μ g de OVA para los grupos (PBS, OVA, OVA/Cry1Ac y OVA/CT); o 100 μ g de Cry1Ac para los grupos (PBS y Cry1Ac). Se evaluaron 4 dosis diferentes de la toxina Cry1Ac (10 μ g, 50 μ g, 100 μ g y 200 μ g). Los cambios de temperatura rectal fueron monitoreados cada 5 min durante 1 hora considerando la caída significativa de la temperatura como una medida de anafilaxis (Fig. 3).

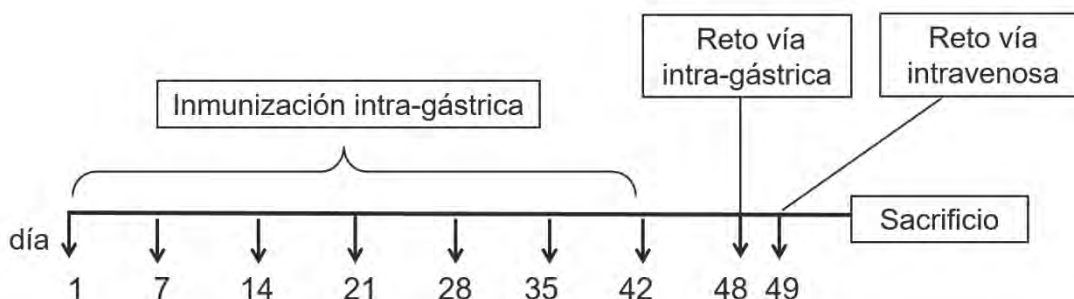


Figura 3. Protocolo de inducción de anafilaxis. Ratones BALB/c hembras fueron inmunizados por vía intra-gástrica con: PBS (vehículo), OVA (tolerizados), OVA + CT (control positivo de alergia), OVA + Cry1Ac y Cry1Ac sola, una vez por semana durante 7 semanas los días 1,7, 14, 21, 28, 35, 42; en el día 48 recibieron un reto antigénico vía intra-gástrica y el día 49 recibieron un reto antigénico por vía intravenosa, inmediatamente después del reto fueron medidos los cambios de temperatura cada 5 min durante 1 hr como medida de anafilaxis y al finalizar la hora, los ratones fueron sacrificados (como se especifica en materiales y métodos).

2.6 Obtención de suero y lavados intestinales

Los ratones fueron sacrificados por sobredosis de anestesia, la sangre fue obtenida mediante punción intra-cardíaca con jeringa de tuberculina de 25G x 16 mm. El suero se recuperó y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min en dos ocasiones y almacenado a -70 °C hasta su uso.

El intestino delgado (ID) e intestino grueso (IG) fueron disectados, separados y lavados mediante una sonda para eliminar el contenido intestinal con 5 mL de medio RPMI para el ID y con 3 mL de medio RPMI para el IG. El lavado de cada intestino fue recuperado y macerado ligeramente con ayuda de un embolo, posteriormente fueron colocados en tubos Corning adicionados con 250 µL de inhibidor de proteasas p-hidroxibenzoato de mercurio (PHMB 100 Mm en TRIZma base 150 mM) para el ID y 200 µL para el IG; se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado, alicuotado y almacenado a -70 °C hasta su uso.

2.7 Determinación de anticuerpos específicos anti-OVA y anti-Cry1Ac

La respuesta de anticuerpos anti-OVA y anti-Cry1Ac en suero y lavados intestinales fueron determinadas mediante ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA) en placas de 96 pozos. Las placas sensibilizaron durante toda la noche a 4 ° C con 100 µL de Cry1Ac (10 µg / mL) u OVA (10 µg / mL) en buffer de carbonato-bicarbonato ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 0.1M, pH 9.6). Posteriormente, se lavaron 3 veces con 300 µL de PBS 1X 0.05 % Tween20. Los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con 0.05% de PBS-Tween20 al 3 % de Albumina de suero bovina (BSA) para las muestras de suero y 0.05% de PBS-Tween20 al 10 % de leche sin grasa para las muestras de lavados intestinales durante 2 horas a 4 °C. Las diluciones en serie de las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C en volúmenes de 100 µL por pozo comenzando con una dilución 1:100 para las muestras de suero, mientras que los lavados intestinales fueron diluidos 1:2 con 20 % de leche sin grasa, fueron incubados toda la noche a 4 °C;

las placas fueron lavadas nuevamente para ser incubadas por 2 horas a 4 °C con los anticuerpos de ratón, anti-IgG1, anti-IgG2a (Invitrogen, California, EE.UU.), anti-IgA (Life Technologies, California, EE.UU.) a una dilución de 1:1000 conjugados con peroxidasa y anti-IgE biotinilado (EBioscience, San Diego, EE.UU.) a una dilución 1:500; nuevamente las placas fueron lavadas 3 veces y reveladas con sustrato ABTS2, 2'-azino-di (3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato con H₂O₂ al 3 %) 100 µL por pozo. Las placas fueron leídas a una absorbancia de 405 nm usando un lector de microplacas (Biotek ELx 800).

2.8 Cuantificación de citocinas y proteasa mMCP-1

Los niveles de citocinas (IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-13, IL-6, TNF- α) fueron determinados en suero por el método de ELISA con kits comerciales (Prepotech, New Jersey, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero fueron utilizadas en una dilución 1:4, mientras que los lavados intestinales fueron utilizados en una dilución 1:2. Las muestras fueron leídas a una absorbancia de 405 nm usando un lector de microplacas (Biotek ELx 800).

los niveles de la proteasa-1 de mastocitos de ratón (mMCP-1 también abreviado como MCPT-1) se cuantificaron en suero, utilizando las instrucciones del fabricante del kit de ELISA para mMCP-1 de (eBioscience, San Diego, EE.UU.), las muestras de suero se utilizaron en una dilución 1:2. Las muestras fueron leídas a una absorbancia de 450 nm usando un lector de microplacas (Biotek ELx 800).

2.9 Obtención de leucocitos de bazo, ganglio mesentérico y placas de Peyer

El Bazo y el ganglio mesentérico (GM) fueron disectados, mientras que las placas de Peyer (PP) fueron disectadas del ID. El bazo, GM y las PP fueron

disgregadas separadamente en cajas Petri a través de un filtro de malla de nylon con medio RPMI-1640 adicionado con 5% de suero fetal de ternera (FCS) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C.

En el caso del bazo, los eritrocitos se lisaron con (NH₄Cl 150 mM, Tris-HCl 100 Mm, pH 7.4) durante 5 min, se lavaron con PBS y fueron nuevamente centrifugados a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C. Posterior a la centrifugación las pastillas de leucocitos de bazo, GM y PP fueron re suspendidas en BSA al 0.5% en PBS y se tiñeron con mAbs marcados con fluorocromos para su posterior análisis por citometría de flujo como se describe en la sección 2.11.

2.10 Obtención de células intraepiteliales y de lámina propia

Una vez disectados el ID e IG y obtenidos los lavados intestinales, las células intraepiteliales fueron obtenidas, con ayuda de un ganchillo crochet #6. Una vez invertidos se colocaron en tubos cónicos de 50 mL conteniendo 20 mL de medio RPMI + EDTA (1.5 Mm) + DTT (0.015 %) y se incubaron durante 30 min en agitación constante a 120 rpm a 37 °C. Posterior a la incubación los intestinos fueron adicionados con 200 µL de suero neonatal bovino descomplementado, fueron macerados levemente y el sobrenadante fue recuperado (células intraepiteliales), las células fueron filtradas y centrifugadas a 1500 rpm/10 min a 4°C, recuperadas nuevamente re suspendidas en 2-3 mL con BSA al 0.5% en PBS para su posterior tinción con mAbs marcados con fluorocromos para su posterior análisis por citometría de flujo como se describe en la sección 2.11.

Para la obtención de células de lámina propia , los intestinos usados previamente para la obtención de células intraepiteliales, fueron recuperados y colocados en tubos de 50 mL conteniendo 20 mL de RPMI + Colagenasa IV (60 U/ml), los cuales se incubaron a 37°C en agitación constante a 120 rpm durante 30 min. Los intestinos fueron recuperados y colocados en cajas Petri donde la

mucosa intestinal fue disgregada con ayuda de un embolo principalmente el IG para liberar las células de la lámina propia, las cuales fueron recuperadas, filtradas mediante una tela de nylon para eliminar restos de tejido adiposo y dendrito, se centrifugaron a 1500 rpm/10 min a 4°C. Finalmente, las células se re suspendieron en 2-3 mL de BSA al 0.05 % en PBS y se tiñeron con mAbs marcados con fluorocromos para su posterior análisis por citometría de flujo como se indica en la sección 2.11.

2.11 Citometría de flujo

Los leucocitos obtenidos de bazo, GM, PP, así como las células intraepiteliales y de lámina propia fueron tratadas con anticuerpos para bloquear el receptor FcγII/ III (anti-CD16/32) y lavadas con BSA al 0.05% en PBS. Posteriormente, las células se incubaron durante 20 minutos a 4 ° C con 25 μL de los anticuerpos monoclonales diluidos 1:1000 IgE-FITC (BioLegend, San Diego, EE.UU.), B220-PECy5 (eBioscience, San Diego, EE.UU.), Siglec-F -PE (eBioscience, San Diego, EE.UU.) y Gr1-APC (BioLegend, San Diego, EE.UU.). Las células se lavaron con BSA al 0.05% en PBS y se re suspendieron en 300 μL de paraformaldehído al 1% para el análisis por citometría de flujo. Las intensidades de fluorescencia relativas se obtuvieron utilizando el citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.) y el software BD Cell Quest Pro v.5.1.1. Se registraron cien mil eventos por muestra y los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo 7.6.

2.12 Análisis histológico

Se realizaron cortes de segmentos de ID e IG de aproximadamente 0.5-1 cm y se fijaron en paraformaldehído al 4%. Los tejidos fueron deshidratados en alcoholes de concentraciones crecientes hasta llegar a alcohol absoluto y embebidos en parafina, los cloques se cortaron en secciones transversales de 3-6 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para su posterior análisis.

En las secciones teñidas de yeyuno y colon, se realizó el conteo de granulocitos totales de veinte secciones transversales por ratón, en 3 ratones de cada grupo mediante microscopia de luz visible (Axiovert Zeiss, New Orleans, EE.UU.). El análisis patológico de las secciones de tejido intestinal fue realizado por servicios especializados de patólogos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

2.13 Ensayo de competencia de unión de OVA y Cry1Ac a la superficie celular de macrófagos

Se realizaron ensayos de competencia de OVA y Cry1Ac en macrófagos RAW264.7 usando el método estandarizado por [23,26]. Las células se pre incubaron a 4 °C con buffer de bloqueo (PBS con BSA al 1%) y Cry1Ac sin marcar (200 µg / mL) u OVA (1 mg / mL) durante 30 min en hielo. Posteriormente se añadió el ligando marcado OVA-FITC (3 µg / mL) y se continuó la incubación durante otra hora más en hielo. Las muestras se fijaron y se analizaron mediante citometría de flujo. Las intensidades de fluorescencia relativas se obtuvieron utilizando el citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.) y el software BD Cell Quest Pro v.5.1.1. Se registraron cincuenta mil eventos por muestra y los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo 7.6.

2.14 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con Análisis de Varianza de Una vía (ANOVA) para comparaciones múltiples, seguida de la prueba de Kruskal-Wallis para comparar todos los grupos y pruebas post comparación de Dunn o Mann Whitney utilizada para comparar todos los otros grupos con el grupo vehículo y control. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad PRISM versión 5.0. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $P < 0.05$.

3.Resultados

3.1 La toxina Cry1Ac es inmunogénica cuando es administrada por vía intra-gástrica

La inmunogenicidad de la toxina Cry1Ac únicamente había sido evaluada por vía intraperitoneal e intranasal por nuestro grupo de investigación [21], por lo que en este trabajo se evaluó si la toxina Cry1Ac administrada por vía intra-gástrica era capaz de inducir respuesta de anticuerpos específicos utilizando el modelo de alergia alimentaria adaptado del descrito por Perrier et al. [33] y descrito en la Figura 1.

Los grupos inmunizados con OVA/Cry1Ac y Cry1Ac fueron capaces de producir anticuerpos específicos para la toxina Cry1Ac a nivel sistémico en suero y en mucosa en lavados intestinales. En suero, los tratamientos de OVA/Cry1Ac y Cry1Ac indujeron niveles estadísticamente significativos de los anticuerpos IgG1, IgG2a e IgA específicos en comparación con el grupo PBS utilizado como vehículo (Fig. 4A). Por otro lado, en ID, se observó un aumento estadísticamente significativo en los anticuerpos IgG1, IgG2a e IgA en el grupo de Cry1Ac sola en comparación con PBS; mientras que el tratamiento con OVA/Cry1Ac sólo mostró un aumento estadísticamente significativo en los niveles de IgA (Fig. 4B). Estos resultados demuestran que la toxina Cry1Ac es inmunogénica cuando es administrada por vía intra-gástrica a nivel sistémico y en mucosas.

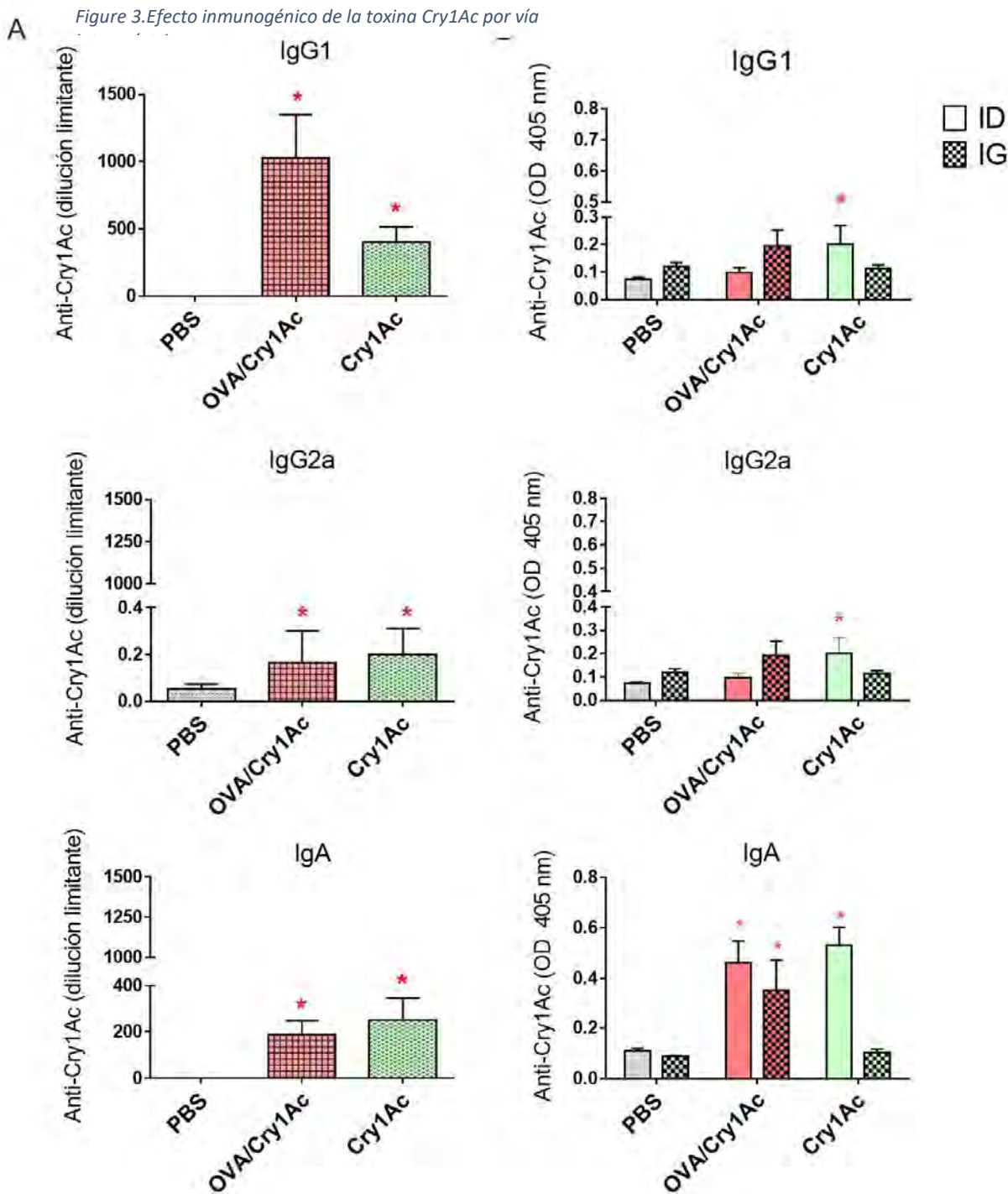


Figura 4. Efecto inmunogénico de la toxina Cry1Ac por vía intra-gástrica. La respuesta de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgA específica para la toxina Cry1Ac se determinó mediante ELISA en muestras de suero y lavados intestinales de intestino delgado (ID) e intestino grueso (IG) obtenidos de ratones BALB/c inmunizados como se describe en materiales y métodos. Las gráficas de barras muestran los niveles de anticuerpos específicos de Cry1Ac en (A) suero, (B) en

intestino, ID (barras lisas) y IG (barras con cuadros). Los datos presentados en las gráficas, se expresan como títulos de anticuerpos para IgG1, IgG2a e IgA en suero y en densidad óptica (OD 405 nm) para IgG1, IgG2a e IgA en ID e IG y representan el promedio \pm SEM de cada grupo. Los datos fueron obtenidos de experimentos independientes usando 4 ratones por grupo (n = 8 a 12 ratones por grupo). Las diferencias significativas están indicadas con * versus PBS con un valor de ($P < 0.05$).

3.2 La toxina Cry1Ac tiene un ligero efecto adyuvante hacia OVA en el modelo de alergia intestinal

Después de confirmar que la toxina Cry1Ac administrada por vía intra-gástrica es inmunogénica, se evaluó si la toxina Cry1Ac administrada por vía intra-gástrica pudiera tener potencial adyuvante hacia OVA. Como era de esperarse el grupo inmunizado con OVA/CT (control positivo de la alergia) mostró efecto adyuvante hacia OVA, observando niveles estadísticamente significativos de IgG1 e IgA específicos para OVA en suero, en comparación con los grupos PBS y OVA (control negativo) (Fig 5A). Mientras que, el grupo inmunizado con OVA/Cry1Ac indujo unciamente niveles significativos del anticuerpo IgG1 pero menores comparados con los observados en el grupo OVA/CT y ligero aumento estadísticamente significativo de IgA en comparación con PBS, nuevamente, estos niveles fueron menores a los inducidos en el grupo OVA/CT.

Estos resultados indican que la toxina Cry1Ac tiene un ligero efecto adyuvante sistémico hacia OVA; sin embargo, no es comparable con el fuerte efecto adyuvante de la CT en este modelo de alergia intestinal (Fig. 5A). Las respuestas de anticuerpos IgG2a registradas fueron muy bajas en todos los grupos y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 5A).

El efecto adyuvante de la CT también se observó a nivel mucosas, ya que esta, fue capaz de inducir niveles estadísticamente significativos de anticuerpos específicos para OVA de IgG1 e IgA en lavados de ID e IG con respecto a los grupos PBS y OVA. En contraste, el tratamiento con OVA/Cry1Ac indujo un aumento estadísticamente significativo sólo en la respuesta anti-OVA IgG2a en ID en comparación con los grupos PBS y OVA (Figura 5B), sin embargo, no es comparable con el efecto adyuvante observado por CT en este modelo de alergia intestinal.

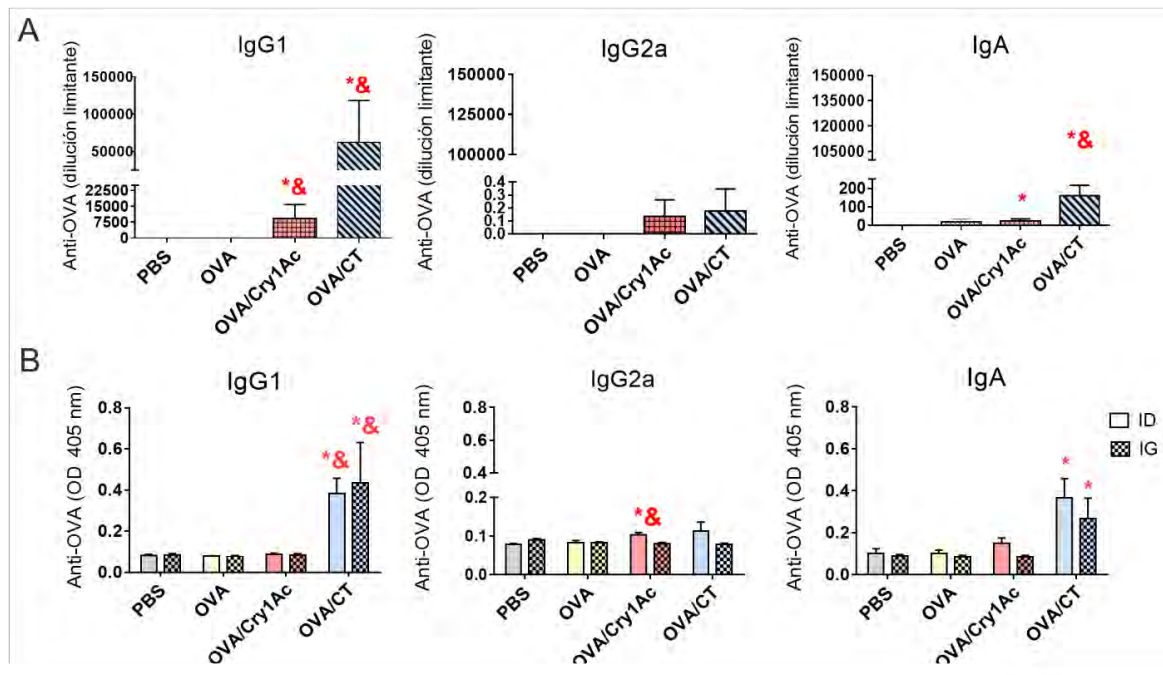


Figura 5. La toxina Cry1Ac tiene un ligero efecto adyuvante hacia OVA caracterizado por IgG1 en suero. La respuesta de anticuerpos específicos hacia OVA fue determinada mediante ELISA. (A) Respuesta de anticuerpos anti-OVA en suero; las gráficas muestran el promedio de la dilución limitante para IgG1, IgG2a e IgA, (B) respuesta de anticuerpos específicos anti-OVA en lavados intestinales de ID (barras lisas) e IG (barras con cuadros); las gráficas de barras muestran el promedio de la (OD 405 nm) para IgG1, IgG2a e IgA. Las gráficas muestran el promedio \pm el SEM de los datos obtenidos en experimentos independientes usando 4 ratones por grupo ($n = 8$ a 12 ratones por grupo); las diferencias significativas están indicadas por: * versus PBS y & versus OVA con un valor de ($P < 0.05$).

3.3 La administración de la toxina Cry1Ac provoca manifestaciones alérgicas

Para definir el potencial alergénico de la administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac, se evaluaron las manifestaciones alérgicas inducidas en ratones sensibilizados. Se obtuvieron resultados similares relacionados con los grupos tolerizados de OVA (50 μ g y 5 mg) analizados, mientras que en los grupos OVA/CT con ambas dosis de OVA se obtuvieron reacciones alérgicas moderadas, pero a mayor magnitud con la dosis alta de 5mg de OVA (Fig. 6A). Por esta razón, solo los resultados con OVA 5 mg se muestran para el grupo control positivo de alergia OVA/CT en las figuras 4-11. Sin embargo, en los grupos OVA/Cry1Ac, en general, utilizando la dosis más alta 5 mg de OVA, los efectos inducidos por la toxina Cry1Ac fueron menores que los observados con la dosis baja con 50 μ g de OVA. Los resultados que se muestran en las figuras para el grupo de OVA/Cry1Ac corresponden a la dosis de 5 mg de OVA a menos que se especifique el uso de la dosis de 50 μ g de OVA en las siguientes figuras.

Los tratamientos con Cry1Ac, OVA/Cry1Ac y OVA/CT (utilizando ambas dosis de OVA), indujeron manifestaciones alérgicas moderadas, evaluadas con el número de veces que los ratones se rascaron, alrededor de la boca, nariz y oídos (más de 10 veces), erizamiento de la piel y diarrea (puntuación de 3, Fig. 6A), mientras que los grupos de PBS y OVA mostraron manifestaciones alérgicas menores (puntuación 1 y 2) (Fig. 6A). No se detectaron diferencias significativas en la temperatura corporal entre grupos (Fig. suplementaria 1).

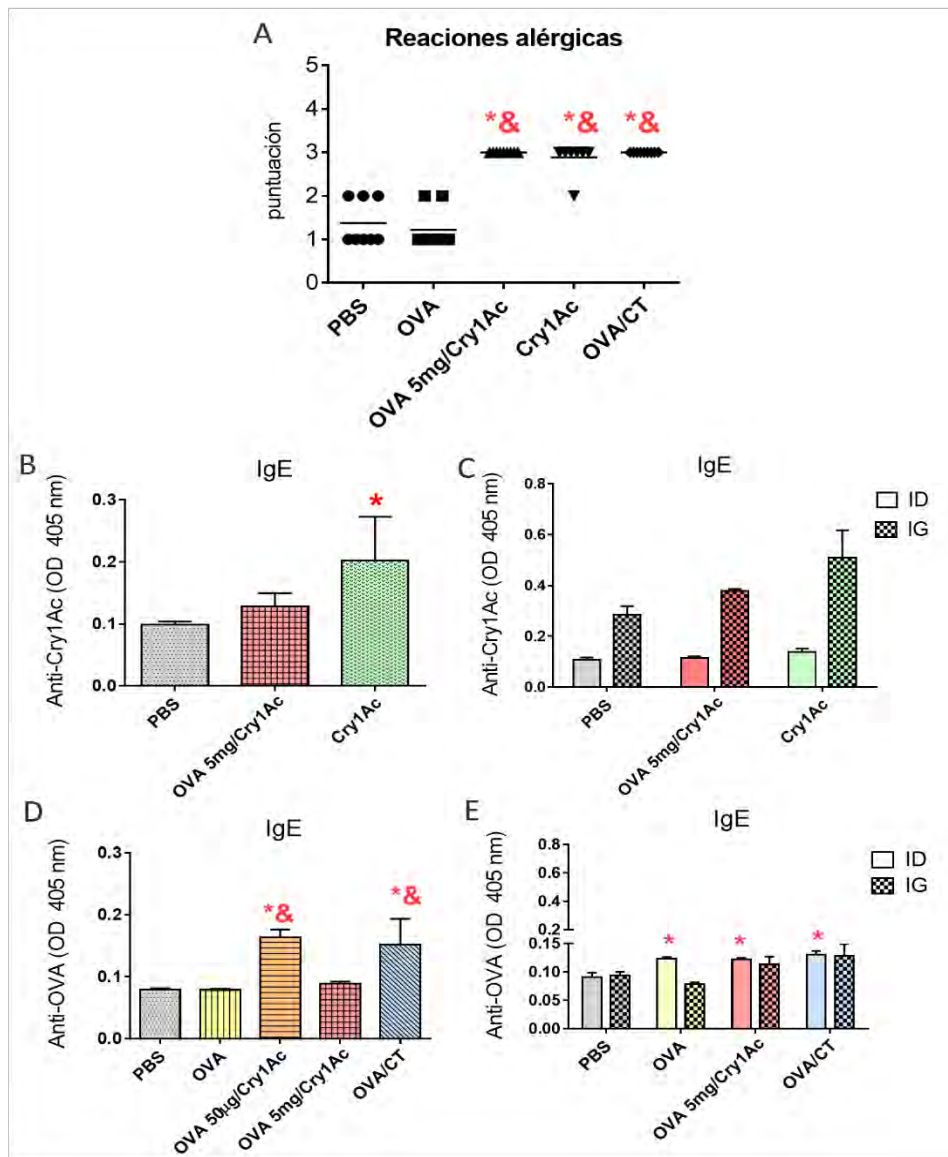


Figura 6. La administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac induce reacciones alérgicas y respuesta específica de IgE. A) Las reacciones alérgicas fueron evaluadas inmediatamente después del reto antigénico por vía intra-gástrica, durante un período de 15 min, de acuerdo al siguiente sistema de puntuación: 0- sin signos; 1- rascarse alrededor de la nariz, orejas y cabeza menos de 10 veces en 15 minutos; 2 rascarse 10 veces en 15 minutos; 3- rascarse más de 10 veces, hinchazón alrededor de los ojos y boca, diarrea, erizamiento de la piel en 15 minutos; 4- reducción de la actividad física y / o dificultad para respirar; 5- muerte; (B) respuesta de IgE anti-Cry1Ac en suero, (C) respuesta de IgE anti-Cry1Ac en ID (barras lisas) e IG (barras con cuadros), (D) muestra la respuesta de IgE anti-OVA en suero y (F) respuesta de anticuerpos IgE anti-OVA en el intestino ID (barras abiertas) e IG (barras cerradas). Los resultados fueron obtenidos de experimentos independientes realizados usando 4 ratones por grupo (n = 8 a 12). Las diferencias significativas ($P < 0.05$) se indican de la siguiente manera: * versus PBS y & versus OVA.

3.4 La toxina Cry1Ac compite con OVA en la unión a la superficie celular de macrófagos RAW264.7

Debido a los efectos menores observados en algunos parámetros que más adelante son mostrados como (el aumento en la proporción de células B220+ IgE+ y células Siglec-F+) como se muestra en las figuras 4-11, en el grupo de OVA/Cry1Ac utilizando la dosis alta de 5 mg de OVA en comparación con la dosis baja de 50 µg de OVA, una posible explicación de estos resultados podría ser que OVA y Cry1Ac compiten por un receptor común y al tener una gran cantidad de OVA 5 mg la respuesta que la toxina Cry1Ac puede inducir sea menor.

Debido a esto, se evaluó la unión de OVA-FITC a la superficie celular de macrófagos de la línea células RAW 264.7 poniendo un exceso de Cry1Ac. Los resultados muestran la unión OVA-FITC a la superficie celular de macrófagos, la cual fue inhibida parcialmente por un exceso de Cry1Ac. (Fig. 7). Teniendo en cuenta que se sabe que la OVA puede ser endocitada en macrófagos a través del receptor de manosa, aún se requieren más estudios para determinar si Cry1Ac usa este mismo receptor [26,37].

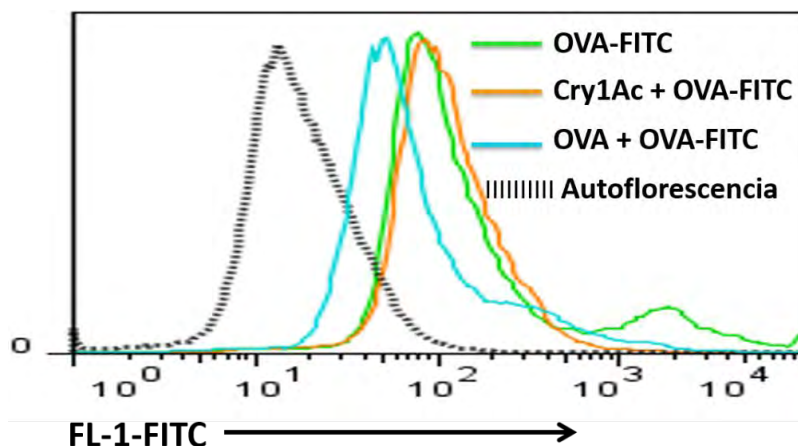


Figura 7. La unión de OVA-FITC a macrófagos RAW264.7 es inhibida parcialmente por la preincubación de los macrófagos con un exceso de

toxina Cry1Ac. Los ensayos de competencia se realizaron en células RAW264.7 incubadas a 4 ° C en buffer de bloqueo, como se describe en materiales y métodos (2.13). Las células se preincubaron durante 30 minutos en hielo con 200 µg / ml De toxina Cry1Ac no marcada u OVA o BSA (como proteína de control no relacionada), posteriormente se incubaron durante 30 minutos en hielo con OVA-FITC (3 µg / ml). Las células se analizaron por citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

3.5 La administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac induce respuesta específica de IgE en suero

Posteriormente, se evaluó si las manifestaciones alérgicas provocadas por la administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac, (codministrada con OVA o sola) podría estar relacionada con el aumento en la respuesta de anticuerpos específicos del isotipo IgE, utilizado como marcador de alergia. Únicamente se observó incremento estadísticamente significativo en los niveles de IgE anti-Cry1Ac en suero en el grupo de toxina Cry1Ac sola en comparación con el grupo PBS (Figura 6B), mientras que en los lavados de ID e IG no se observaron diferencias significativas en los niveles de IgE anti-Cry1Ac entre los tratamientos (Figura 6C).

El grupo sensibilizado con OVA/CT indujo aumento estadísticamente significativo de IgE anti-OVA en suero (Figura 6D) y en ID (Figura 6E); mientras que, el tratamiento con OVA/Cry1Ac indujo niveles estadísticamente significativos de IgE anti-OVA en ID; sin embargo, esta respuesta fue similar a la obtenida en el grupo de OVA (control negativo) pero más altas con respecto al grupo vehículo PBS (Figura 6E).

3.6 La administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac induce un perfil de citocinas mezclado

Se caracterizó si la administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac pudiera modificar el perfil de las citocinas: IFN- γ (Th1), IL-10 (considerada una citocina reguladora), IL-4 e IL-13 (Th2), IL-6 y TNF- α (relacionadas con respuestas proinflamatorias) e IL-17 (relacionada con alergia alimentaria y procesos inflamatorios) [33,34,38]. Se detectaron citocinas en todos los tratamientos en suero y en lavados intestinales. En suero se indujo un perfil de citocinas mezclados, con ligero aumento en los niveles de (IL-10, IL-13, TNF α e IL-6) en los tratamientos con OVA/Cry1A, Cry1Ac y OVA/CT y mayores con respecto a los grupos PBS y OVA (Fig 8A).

Las citocinas también se evaluaron en lavados intestinales, donde se observó un perfil mixto y bajo de citocinas en todos los grupos, sin embargo, solo se detectó incremento estadísticamente significativo de IL-6 en los grupos OVA/CT y Cry1Ac (Fig. 8B).

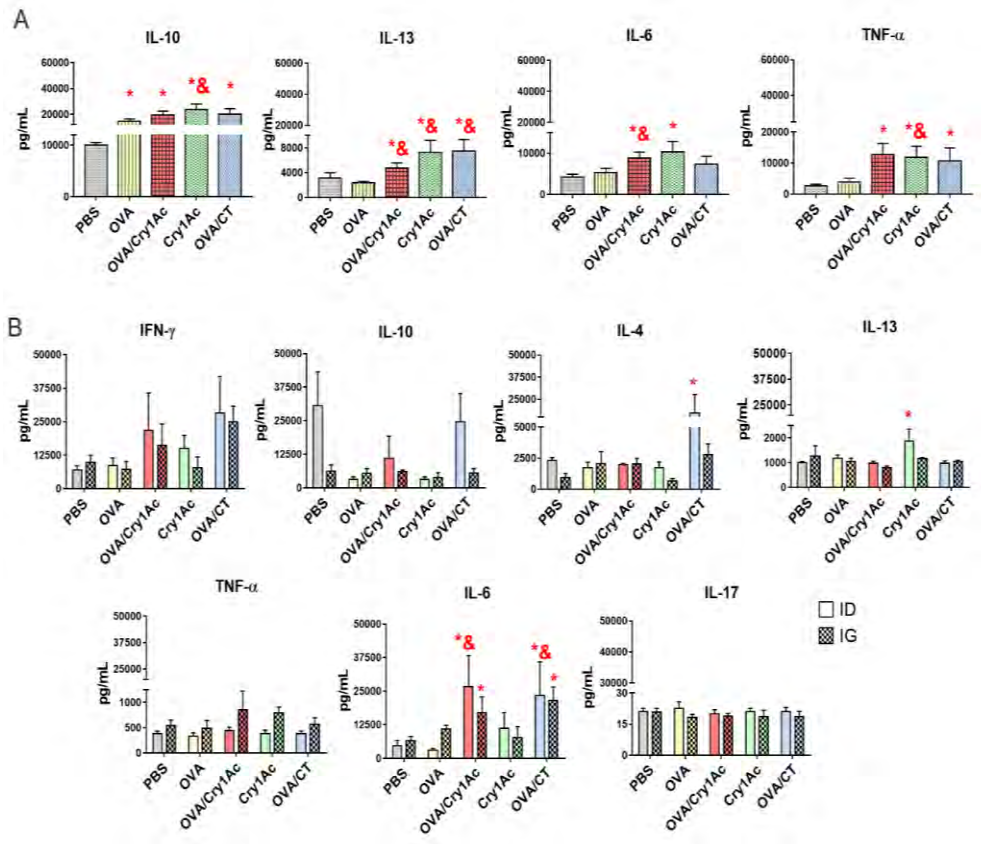


Figura 8. La administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac induce un perfil mixto de citocinas. Las citocinas fueron cuantificadas mediante ELISA en muestras de suero (A) y (B) lavados intestinales de ID (barras lisas) e IG (barras con cuadros). Los resultados representan el promedio \pm SEM de cada grupo (n = 8 a 12 ratones por grupo). Las diferencias significativas se indican de la siguiente manera: * frente a PBS y & frente a OVA con un valor de ($P < 0.05$).

3.7 La toxina Cry1Ac aumenta significativamente la proporción de linfocitos B220 + IgE+ en células de bazo, ganglio linfático mesentérico y placas de Peyer

El incremento del anticuerpo IgE también se evaluó mediante citometría de flujo, evaluando la frecuencia de linfocitos B220+ IgE+ en células del bazo, GM, PP y lámina propia. En células de bazo, la administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac sola indujo un aumento considerablemente significativo en el porcentaje de linfocitos B220+ IgE+ con respecto a PBS y OVA; mientras que el control positivo OVA/CT también exhibió un aumento estadísticamente significativo en

esta población de células en comparación con los controles negativos (Fig. 9A, B). Mientras que en el grupo de OVA/Cry1Ac únicamente se observó aumentó estadísticamente mayor con el resto de los grupos en la proporción de linfocitos B220+ IgE+ utilizando la dosis baja de 50 µg de OVA.

En células de GM, el tratamiento con Cry1Ac sola provoco incremento significativo de linfocitos B220+ IgE+ que los inducidos en PBS y OVA. En el grupo de OVA/Cry1Ac también se observó aumentó estadísticamente significativo, nuevamente utilizando la dosis baja de 50 µg de OVA (en comparación con el grupo de OVA/Cry1Ac con la dosis alta de 5 mg de OVA y por último, en el control positivo de OVA/CT también se observó aumento significativo (Fig 9A-B).

El porcentaje de linfocitos B220+ IgE+ en células de PP aumentó significativamente en el grupo de Cry1Ac en comparación con PBS, mientras que nuevamente el grupo de OVA/Cry1Ac (dosis baja de OVA) fue observado como el grupo con mayor incremento en la proporción de estas células y con un menor porcentaje en comparación con el grupo control positivo OVA/CT ($P < 0.05$) (Fig. 9A,).

El análisis de la proporción de linfocitos B220+ IgE+ también fue evaluada en células obtenidas de lámina propia de ID y IG, sin embargo, no se detectaron cambios significativos en la proporción de estas células entre los diferentes tratamientos (Fig. suplementaria 2).

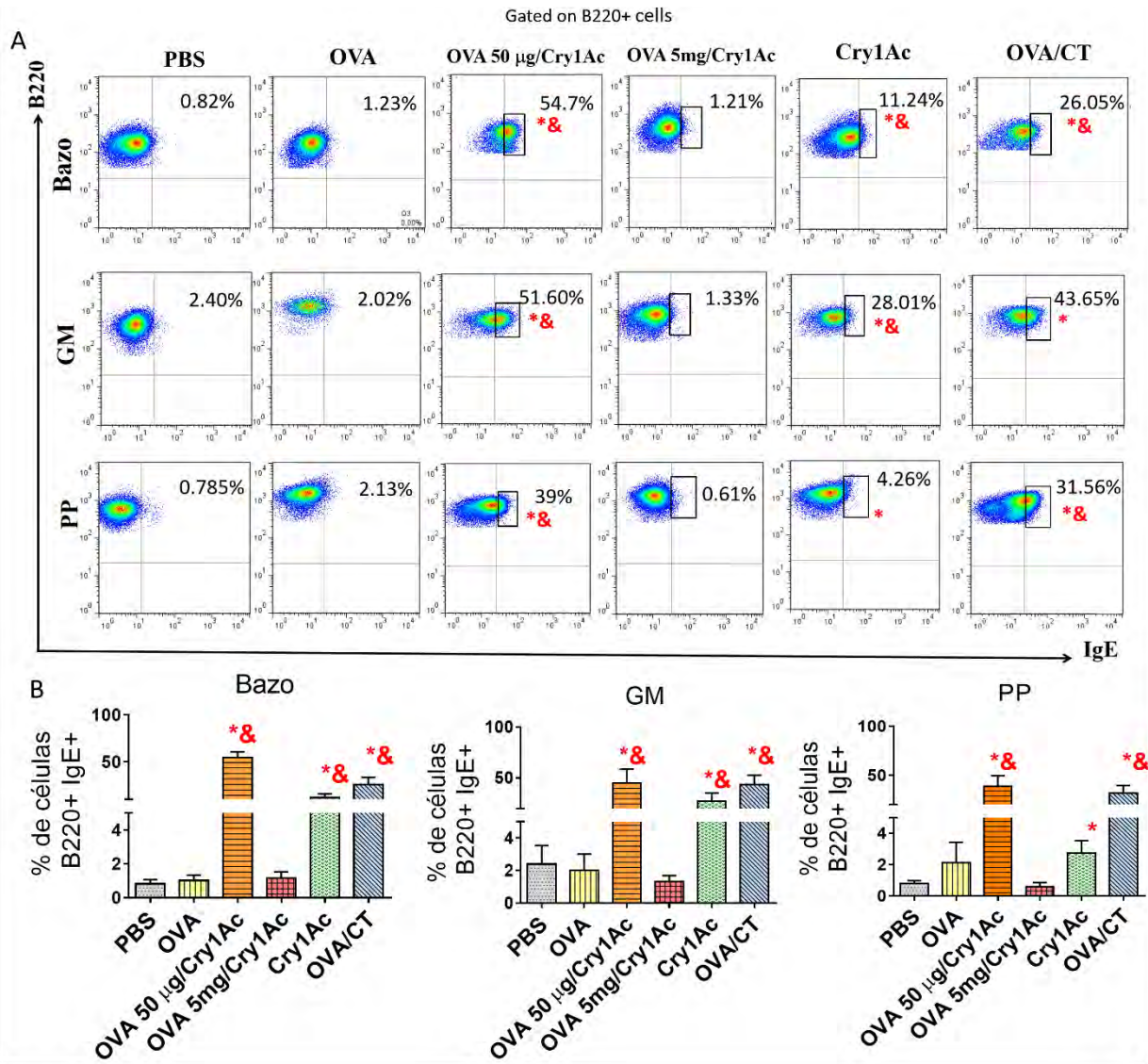


Figura 9. Incremento en la proporción de linfocitos B220+ IgE+ en células de bazo, ganglio mesentérico y placas de Peyer. Se obtuvieron células de bazo, ganglio mesentérico (GM) y placas de Peyer (PP) de ratones BALB / c, tratados como se describe en la figura 1. Las células se tiñeron con mAbs y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la proporción de linfocitos B220+ IgE+. (A) Dot plots representativos de cada grupo de células de bazo, MLN y PP que indican el porcentaje de linfocitos B220+ IgE+ (cuadro negro). (B) las gráficas de barras muestran los valores del promedio \pm SEM del porcentaje de linfocitos B220+ IgE+ de cada grupo. Los datos mostrados se obtuvieron de experimentos independientes ($n = 8$ a 12 ratones por grupo); las diferencias significativas se indican con: * versus PBS y & versus OVA con un valor de ($P < 0.05$).

3.8 La administración de la toxina Cry1Ac incrementa el número de eosinófilos y granulocitos totales en intestino

Los eosinófilos se analizaron por citometría de flujo en células de lámina propia de intestino utilizando el anticuerpo Siglec-F como marcador de eosinófilos. En células de lámina propia de ID, el porcentaje de células Siglec-F+ en los grupos de OVA, OVA/Cry1Ac, Cry1Ac y OVA/CT fueron significativamente más altos que en el grupo PBS utilizado como vehículo (Fig. 10A-B). En IG, el grupo de OVA/CT mostró un aumento significativo en el porcentaje de células Siglec-F+ con respecto a PBS, mientras que en los grupos inmunizados con la toxina Cry1Ac coadministrada y sola no se observó aumento significativo en el porcentaje de células Siglec-F+ (Fig. 10A, B).

El número de granulocitos totales también fue analizado por microscopía en secciones de tejido intestinal de ID e IG. Se encontró un aumento estadísticamente significativo en las secciones de ID en los grupos OVA, OVA/Cry1Ac, Cry1Ac y OVA/CT en comparación con el grupo de PBS ($P < 0.05$) (Fig. 10C). Del mismo modo, en las secciones IG, el número de granulocitos por campo aumentó considerablemente en los grupos OVA/Cry1Ac, Cry1Ac y OVA/CT en comparación con el PBS y OVA ($P < 0,05$) (Fig. 10D).

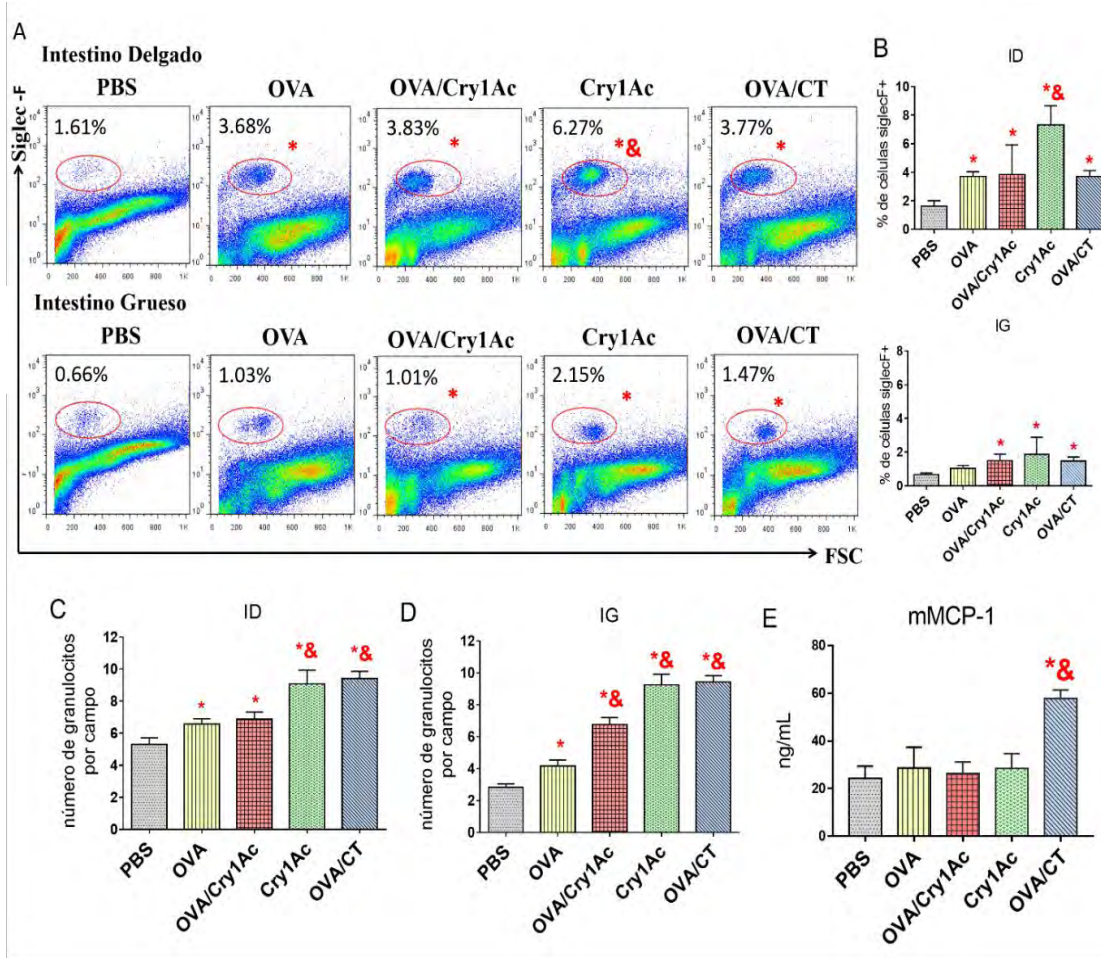


Figura 10. Análisis de células Siglec-F+ en células de lámina propia, conteo de granulocitos en intestino y cuantificación de mMCP-1. Se llevó a cabo la obtención de células de lámina propia de ID e IG, y se tiñeron con mAb para determinar por citometría de flujo la proporción de células Siglec-F+ (eosinófilos) como se indica en materiales y métodos. (A) los dot plots son representativos de cada grupo y muestran el porcentaje de células Siglec-F+ (circulo en rojo) de cada tratamiento. (B) las gráficas de barras indican el promedio \pm SEM correspondiente al porcentaje de células Siglec-F+ en ID e IG de cada grupo. (C) conteo total de granulocitos en tejido de ID e (D) IG teñidos con H&E, las gráficas indican el promedio \pm SEM del conteo de granulocitos de veinte secciones transversales independientes ($n = 5$ ratones por grupo). (E) Cuantificación mediante ELISA de la proteasa de mastocitos de ratón mMCP-1 en suero ($n = 8-12$ ratones por grupo). Las diferencias significativas con una ($P < 0.05$) se indican de la siguiente manera: * versus PBS y & versus OVA.

3.9 La toxina Cry1Ac no induce aumento en los niveles mMCP-1 en suero

Únicamente se observó incremento estadísticamente significativo en los niveles de la proteasa mMCP-1 en suero en el control positivo de alergia de OVA/CT con respecto al resto de los grupos (Fig. 10E). Mientras que los grupos inmunizados con la toxina Cry1Ac (OVA/Cry1Ac y Cry1Ac) mostraron niveles de la proteasa mMCP-1 muy similares a los grupos PBS y OVA y menores a los observados por el control positivo de alergia (Fig. 10E).

3.10 La administración intra-gástrica de Cry1Ac induce hiperplasia intestinal linfoide en colon

En secciones de ID e IG se llevó a cabo el análisis histopatológico del ejido intestinal, en el cual, los grupos control (PBS y OVA) se observó la conservación de la morfología normal intestinal. Por el contrario, en IG de ratones tratados con OVA/Cry1Ac, Cry1Ac y OVA/CT se observó hiperplasia del tejido linfoide intestinal especialmente en colon, caracterizado por abundante infiltrado constituido principalmente por linfocitos (Fig. 11A). Para determinar si la hiperplasia linfoide podría ser reversible una vez que se suspendieran las inmunizaciones evitando la exposición nuevamente con los antígenos; se realizó el análisis histológico intestinal en grupos adicionales de ratones que recibieron el esquema de sensibilización de 8 semanas y permanecieron 4 semanas más vivos sin recibir más inmunizaciones con los antígenos. El análisis histológico reveló que la presencia de hiperplasia intestinal persistió después de 4 semanas en los grupos OVA/Cry1Ac, Cry1Ac y OVA/CT (Fig. 11B).

Además de la hiperplasia linfoide en colon, se identificaron otros cambios histopatológicos tanto en ID como en IG, que fueron; enteritis linfoplasmocítica, hiperplasia de células caliciformes, edema y desprendimiento epitelial, estos cambios fueron también observados en los grupos de Cry1Ac y OVA/Cry1Ac

(Tabla 3A), sin embargo, las alteraciones fueron más graves en el grupo control positivo de OVA/CT en comparación con los grupos con toxinas Cry1Ac y los controles negativos (Tabla 3B).

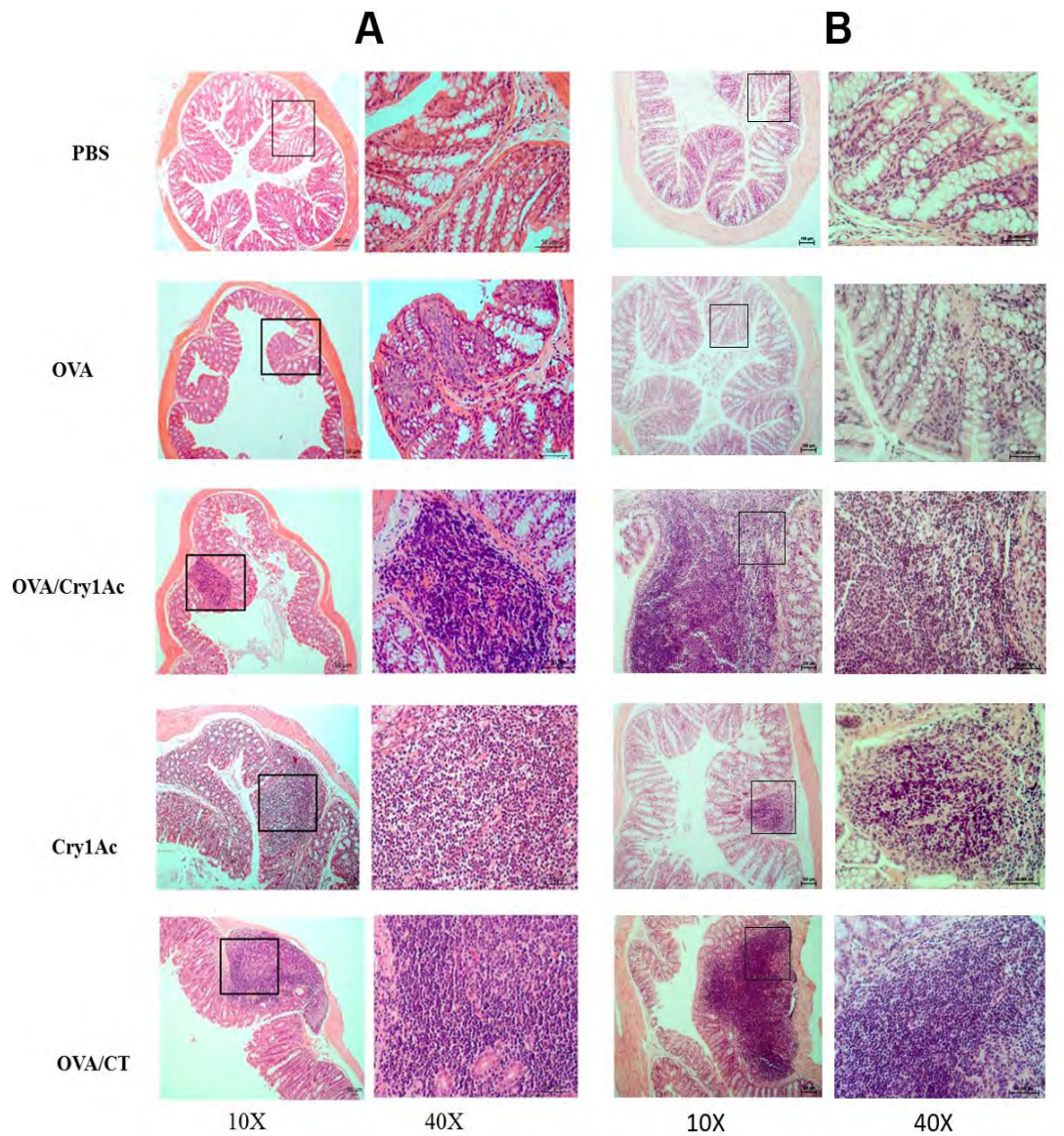


Figura 11. La toxina Cry1Ac induce hiperplasia del tejido linfoide en intestino. Secciones de IG obtenidas de ratones BALB/c, fueron teñidas con H&E y analizadas histopatológicamente. (A) imágenes representativas de secciones de colon de cada grupo (n = 8 a 12 ratones por grupo) de ratones que recibieron el esquema de sensibilización, reto por vía intra-gástrica y sacrificados

el día 49 y (B) imágenes representativas de la persistencia de la hiperplasia del tejido linfóide en los tratamientos con OVA/Cry1Ac, Cry1Ac y OVA/CT, retados por vía intra-gástrica el día 49 y sacrificados hasta el día 84 quedando durante 1 mes sin inmunizar.

Tabla 3. Cambios histopatológicos registrados en intestino delgado e intestino grueso de ratones BALB/c.

ID	PBS	OVA	OVA/Cry1Ac	Cry1Ac	OVA/CT
Enteritis linfoplasmocítica	(+) leve, focal	(+) leve, multifocal	(+) Leve, multifocal/difuso	(+) Leve/moderado, difuso/multifocal	(+) Leve/moderado, difuso
Hiperplasia de células Globo	(-)	(-)	(+) Leve/moderado/severo, difuso	(+) Leve/moderado, multifocal	(+) Leve/moderado, difuso
Hiperplasia del tejido linfóide	(-)	(-)	(+) Leve/moderado, focal	(+) Severo, focal	(+) leve/moderado/severo, focal
Edema	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Linfangiectasia	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Daño epitelial	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
ID					
Enteritis linfoplasmocítica	(-) Ausente/leve, focal	(-) Ausente/leve, focal	(+) Leve, multifocal	(+) Leve, multifocal	(+) Leve, multifocal/difuso
Hiperplasia de células globo	(-) Ausente/leve, focal	(-) Ausente/leve, focal	(+) Leve/moderado multifocal	(+) leve/moderado multifocal/difuso	(+) Leve/moderado difuso
Hiperplasia del tejido linfóide	(-) Ausente	(-) Ausente/leve, focal	(+) Leve/moderado, focal/multifocal	(+) Leve/moderado, focal	(+) Leve/moderado a severo, focal
Edema	(-)	(-) Ausente/leve, difuso	(+) Moderado, difuso	(+) Leve, difuso	(+) Moderado, difuso
Linfangiectasia	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Daño epitelial	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)

Los cambios histopatológicos registrados en tejido de ID e IG de cada grupo tratado como se describe en materiales y métodos, se marcaron como (+) positivos o (-) negativos cuando estuvieron presentes o ausentes en al menos 70% de ratones. Algunas observaciones están indicadas en grupos marcados negativamente cuando fueron registrados cambios histopatológicos solo en algún ratón por grupo. Los datos resumen las observaciones registradas en secciones de tejido de 9 ratones por grupo.

3.11 La toxina Cry1Ac es capaz de inducir anafilaxis solo por vía intravenosa

Las respuestas alérgicas moderadas observadas mediante la escala de signos y síntomas registradas en los grupos sensibilizados con la toxina Cry1Ac por vía intra-gástrica, que se evaluaron posteriormente a que los ratones recibieron el reto antigénico por la misma vía, nos llevaron a probar si esta toxina podría ser capaz de provocar anafilaxis por esta vía y si además, utilizando dosis más altas de la toxina para las inmunizaciones y el reto antigénico podrían inducir anafilaxis. La anafilaxis fue evaluada mediante el descenso de la temperatura posterior al reto antigénico (vía intra-gástrica) en donde, solo el grupo de OVA/ CT registró una ligera caída de la temperatura (Fig. 12A). Ya que se sabe que es difícil poder observar anafilaxis únicamente usando administraciones antigénicas orales [31], decidimos evaluar si la toxina Cry1Ac podría ser capaz de inducir anafilaxis utilizando un reto sistémico por vía intravenosa con el fin de potenciar la respuesta el cual fue administrado un día después del reto por vía intra-gástrica con OVA o con Cry1Ac dependiendo del tratamiento en grupos adicionales de ratones como se especifica en la Fig. 12A.

Se observó que en ratones sensibilizados con diferentes dosis de Cry1Ac (10, 50, 100 o 200 µg), se registró descenso significativo de la temperatura después del reto por vía intravenosa (Fig. 12C). Esta caída se observó desde los primeros minutos y se mantuvo durante 35 minutos, en comparación con los ratones que fueron únicamente retados por vía intra-gástrica en los que no se registró descenso de la temperatura con ninguna dosis evaluada de la toxina Cry1Ac (Fig. 12A), mientras que en el control positivo OVA/CT, se observó un marcado descenso de la temperatura después del reto antigénico por intravenosa, (Fig. 12B). Esta caída fue más pronunciada que la provocada en los grupos retados con la toxina Cry1Ac, reforzando el potencial alérgico de la CT que fue superior en comparación con el potencial inducido por la toxina Cry1Ac.

Los grupos de PBS retados por vía intra-gástrica e intravenosa con OVA, Cry1Ac o PBS no provocaron cambios significativos en el descenso de la temperatura (Fig. 12D).

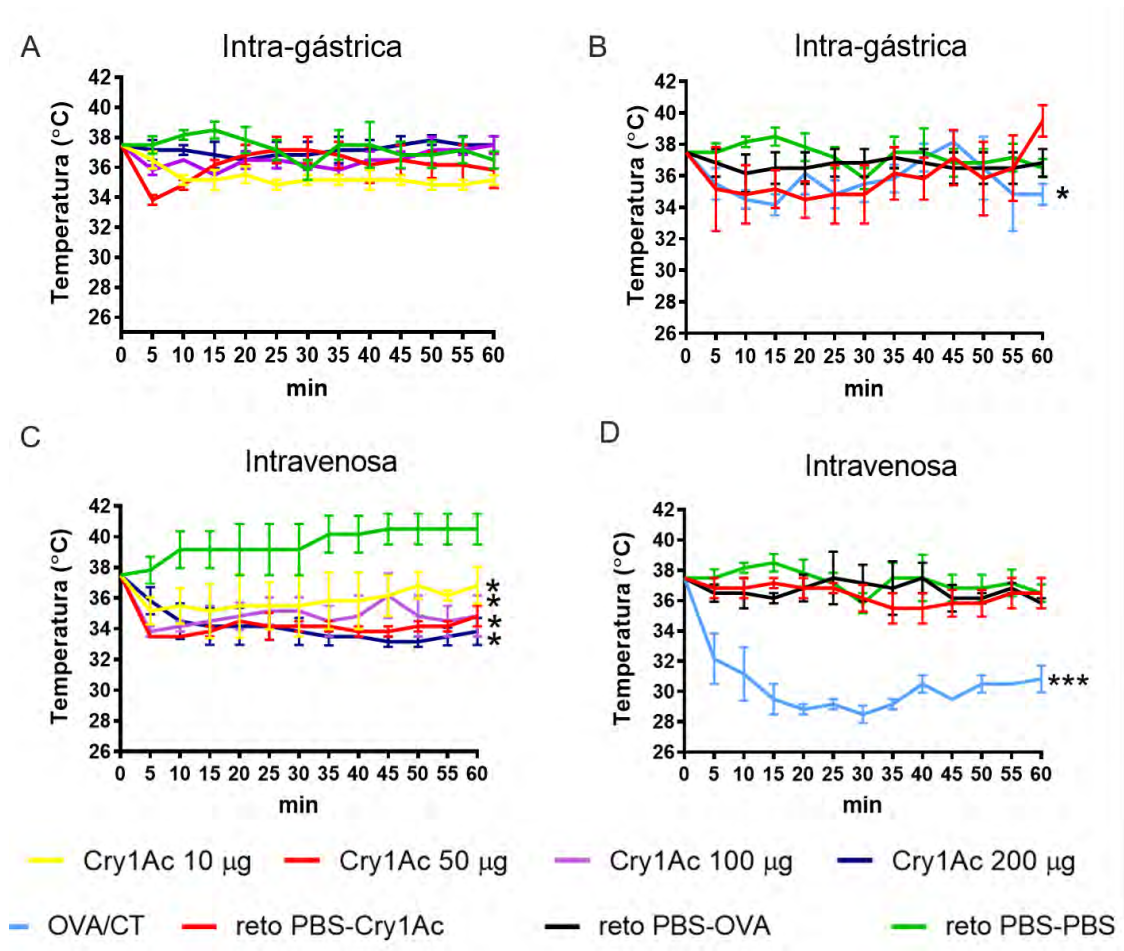


Figura 12. El reto intravenoso con OVA o la toxina Cry1Ac induce anafilaxis. (A) Ratones BALB / c inmunizados una vez por semana durante siete semanas con diferentes dosis de la toxina Cry1Ac (10, 50, 100 o 200 µg de Cry1Ac), recibieron en el día 48 un reto antigénico por vía intra-gástrica con 300 µg de toxina Cry1Ac y fueron evaluados los cambios en la temperatura cada 5 min por una hora como se especifica en la sección materiales y métodos, (B) promedio de los cambios en la temperatura de ratones que recibieron el reto por vía intra-gástrica con 20 mg de OVA para el grupo OVA/CT y PBS, 300 µg de toxina Cry1Ac para otro grupo PBS, (C) temperatura de ratones inmunizados y retados por vía intra-gástrica en el día 48 y que un día después recibieron un reto antigénico por vía intravenosa con 100 µg de la toxina Cry1A para el grupo PBS y los diferentes grupos de toxina Cry1Ac (10, 50, 100 o 200 µg de Cry1Ac)

y (D) promedio de la disminución de la temperatura de ratones inmunizados y retados por vía intra-gástrica en el día 48 y un día después retados por vía intravenosa con 100 µg de OVA para los grupos de PBS y OVA/CT; 100 µg de toxina Cry1Ac para otro grupo PBS y con PBS. Los resultados mostrados en A-D se obtuvieron usando 3 a 5 ratones por grupo. Diferencias significativas con una ($P<0.05$) y se indican de la siguiente manera: * versus la estimulación con PBS (OVA); *** versus el reto de PBS con (Cry1Ac, OVA, PBS) y * versus la estimulación con PBS (PBS).

4. Discusión

Los resultados obtenidos indican que la toxina Cry1Ac por vía intra-gástrica tiene la capacidad de generar respuestas inmunes moderadas relacionadas con la alergia. Se observó que los grupos administrados con OVA/Cry1Ac y Cry1Ac, pero particularmente el grupo de Cry1Ac sola, provocaron algunas manifestaciones relacionadas con la alergia, comparables en magnitud a las inducidas por el control positivo de alergia OVA/CT.

Entre las respuestas relacionadas con la alergia están: las reacciones alérgicas moderadas observadas; el aumento significativo de la proporción de linfocitos IgE+ en células de bazo, GM y PP; incremento en la proporción de granulocitos en células de lámina propia de intestino y en secciones de tejido intestinal y la presencia de hiperplasia del tejido linfoide en colon. Sin embargo, el efecto adyuvante en mucosas de la CT medido por el aumento en los niveles de anticuerpos específicos para el antígeno OVA fue mayor en comparación con el ligero efecto adyuvante inducido por la toxina Cry1Ac. Además, el incremento en los niveles de la proteasa Mmcp-1 y la magnitud del descenso de la temperatura después del reto antigénico por vía intravenosa, fueron mayores en el control positivo de alergia OVA/CT que en los grupos inmunizados con la toxina Cry1Ac; indicando un menor potencial de la toxina Cry1Ac para promover la alergia y anafilaxis con respecto al potencial alergénico de la CT en este modelo de alergia alimentaria.

Las reacciones alérgicas moderadas observadas en el presente estudio por los tratamientos con Cry1Ac y OVA/CT fueron similares a las registradas en el modelo murino de alergia alimentaria con OVA establecido por Perrier et al. [33]. Del mismo modo, se observaron manifestaciones moderadamente alérgicas, como comezón y el erizamiento de la piel que han sido reportadas en pacientes con alergia a los alimentos [39].

Nuestros resultados indican que la toxina Cry1Ac es inmunogénica cuando se administra por vía intra-gástrica, ya que los tratamientos con OVA/Cry1Ac y

Cry1Ac indujeron respuestas de anticuerpos sistémicos y en mucosa (Figura 3). En trabajos previos, se había demostrado la inmunogenicidad de varias toxinas Cry como; Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1Aa y Cry3A pero únicamente administradas por vía intranasal e intraperitoneal, utilizando un esquema que consistió en solo 3 inmunizaciones [21]. La capacidad adyuvante de la toxina Cry1Ac por vía intragástrica es ligera, ya que la coadministración de OVA con la toxina Cry1Ac sólo indujo respuestas significativas de los anticuerpos IgG1 e IgA específicos para OVA en suero (Figura 4); y estas respuestas fueron mucho menores que las inducidas en el grupo OVA/CT, ya que como era de esperarse, la CT mostró claramente un potente efecto adyuvante sistémico y en mucosas similar al reportado en otros estudios en los que la CT ha sido utilizada como adyuvante y potencial alergénico en modelos de alergia [33,40,41].

Mediante citometría de flujo y microscopía, encontramos que el número de eosinófilos aumentó significativamente en intestino, en el control positivo OVA/CT, así como en los grupos de OVA/Cry1Ac y Cry1Ac. Similar a nuestros resultados, el aumento en el número de eosinófilos se ha sido observado en sangre en varios modelos de alergia alimentaria como en el trabajo de Brandt et al. [42]. También en el estudio de Zeljenková et al., en el que se evaluó el efecto producido al alimentar ratas con 11% o 33% con maíz MON 810 genéticamente modificado que expresa la toxina Cry1Ab como proteína insecticida durante 5 y 14 semanas, encontraron incremento en el número de eosinófilos en sangre; sin embargo, no realizaron la evaluación de parámetros relacionados con la alergia ni el análisis a nivel intestinal; a pesar de que las ratas alimentadas con maíz GM presentaron algunos signos de toxicidad hepatorenal; los autores concluyeron que el maíz MON810 era tan seguro como las variedades convencionales de maíz [12].

En la mayoría de los estudios en los que se ha evaluado la bioseguridad de las plantas transgénicas de Bt, los posibles cambios o daños que las toxinas Cry podrían provocar en órganos como el intestino no son evaluados microscópicamente. Por esta razón, en el presente trabajo, realizamos el

análisis histológico del tejido intestinal de ratones inmunizados con la toxina Cry1Ac. El principal cambio observado en los grupos tratados con OVA/Cry1Ac, Cry1Ac y OVA/CT fue hiperplasia del tejido linfoide registrada en secciones de colon.

En humanos, los folículos linfoides aislados se encuentran normalmente en todo el intestino, pero se sabe que su presencia aumenta en las regiones del ciego y el recto, sin embargo, una alta densidad de folículos linfoides está relacionado a condiciones patológicas. Además, ha sido caracterizado que bajo condiciones inflamatorias, el número, diámetro y la densidad de los folículos linfoides aislados aumentan [43]. Algunos estudios han detectado hiperplasia nodular del intestino linfoide asociada con la infección por *G. intestinalis*, *H. pylori* y en estados de inmunodeficiencia, como la deficiencia de IgA. En la mayoría de estos casos, la hiperplasia linfoide se observó en ID [44,45], mientras que en el presente trabajo. la hiperplasia linfoide intestinal fue observada en colon, la cual ha sido asociada a alergia alimentaria tanto en niños como en adultos [46,47] ya que en algunos estudios han demostrado consistentemente una asociación entre la alergia alimentaria y la presencia de hiperplasia linfoide en colon, debido a que el número de pacientes sin hiperplasia linfoide en colon y sin alergia por alimentos fue mucho menor que los que presentaban ambas [48,49].

Además de su asociación con la alergia alimentaria, la presencia de hiperplasia nodular linfoide intestinal también se ha relacionado enfermedades inflamatorias intestinales como la enfermedad celíaca, linfoma y carcinoma de colon [50–54]. En la enfermedad inflamatoria intestinal, la presencia de hiperplasia nodular linfoide intestinal ha sido propuesta como un marcador de inflamación de bajo grado [45].

Con base en los resultados actuales que muestran la inducción de hiperplasia linfoide nodular intestinal en colon por la administración intra-gástrica de la toxina Cry1Ac, consideramos importante realizar más estudios para determinar si la ingesta de toxinas Cry puede estar asociada con una mayor presencia de

hiperplasia linfóide nodular en humanos, ya que estas estructuras pueden estar relacionadas con alergia a los alimentos y / o con afecciones inflamatorias intestinales.

Nuestros resultados actuales que demuestran el potencial de la toxina Cry1Ac para inducir respuestas relacionadas con la alergia alimentaria, difieren de los efectos reportados en el estudio de Reiner et al. [55] con la toxina Cry1Ab utilizando un modelo experimental de asma alérgica o reactividad de la enfermedad inducida con OVA, ya que no observaron manifestaciones alérgicas en ratones que consumieron aproximadamente 19 μg por día de toxina Cry1Ab, alimentados con una dieta que incluía 33% de maíz Bt que contenía aproximadamente 0.0013% de Cry1Ab durante 32 o 34 días. Los diferentes resultados pueden deberse a las diferencias entre las toxinas Cry1A o por el modelo de alergia utilizado y las distintas dosis. Sin embargo, los autores argumentaron que la ausencia de respuesta alérgica podría deberse a la desnaturalización de la toxina Cry1Ab durante el procesamiento de los alimentos.

Asimismo, en un estudio reciente de Andreassen et al. [27] no se encontraron pruebas de la inmunogenicidad o alergenicidad de la toxina Cry1Ab en ratones a cuando fue coadministrada con el antígeno lupina conocido por ser un alérgeno, utilizando varias administraciones por vía intra-gástrica con dosis bajas de la toxina Cry1Ab (10 μg) comparada con la utilizada en nuestro estudio (50 μg) y retos antígenos por vía intraperitoneal, versus vía intra-gástrica e intravenosa utilizada en este trabajo. Cabe señalar que en el estudio de Andreassen et al., incluso en el control positivo de alergia coadministrado con CT como adyuvante más su alérgeno Lupina no se detectaron respuestas de anticuerpos específicas significativas ni IgE, ni cambios en el perfil de citocinas en suero. Estos resultados también podrían explicarse por las diferencias en la secuencia entre Cry1Ab y Cry1Ac o las diferentes dosis y vías de administración utilizadas, así como por las diferencias derivadas de la modificación de las secuencias del gen nativo Cry para aumentar su efectividad insecticida en

plantas transgénicas de Bt [56,57]. Por lo tanto, se requieren más estudios detallados en los que se compare la inmunogenicidad y alergenicidad de estas proteínas Cry1A en condiciones apropiadas y similares utilizando modelos murinos realistas que reflejen las vías y las dosis posibles que pueden ser consumidas en estas plantas por vertebrados (animales de crianza y humanos) para determinar su potencial alergénico.

Es importante resaltar que con la dosis de 50 µg de proteína / 25 g de ratón pudimos observar la inmunogenicidad y el potencial alergénico moderado de la toxina Cry1Ac en este modelo de alergia alimentaria en ratón; extrapolando estos datos a una persona de 70 kg, sería necesario consumir 140 mg de la toxina sola para inducir efectos inmunogénicos similares a los observados en nuestro estudio. Estos niveles no podrían alcanzarse fácilmente mediante el consumo de algunas plantas transgénicas de Bt en las que los niveles de expresión de las toxinas Cry han sido estimados por ser muy bajos (es decir, 0.0013% del contenido de proteína en el maíz MON810) [55]; sin embargo, hay amplias variaciones en las mediciones de las concentraciones de Cry estimadas en las plantas transgénicas Bt [55], ya que han sido encontradas y reportadas plantas transgénicas de Bt como el brócoli que expresan niveles de la toxina mucho más altos de hasta 0.4% de proteína total. Además, es importante mencionar que los niveles de expresión de las toxinas Cry en plantas transgénicas puede diferir considerablemente [58]. Teniendo en cuenta estos aspectos, la dosis requerida para observar un efecto inmunoestimulante o alergénico debido a la toxina Cry1Ac podría lograrse mediante la ingestión de una cantidad mucho menor de plantas de Bt de lo que se pensó originalmente.

Es importante señalar que en este estudio utilizamos una toxina Cry1Ac nativa purificada, mientras que las proteínas expresadas en plantas transgénicas están modificadas o truncadas, por lo que como resultado de estas modificaciones pueden tener diferentes propiedades inmunológicas. También recomendamos llevar a cabo evaluaciones adicionales de la alergenicidad de cada planta transgénica utilizando modelos de alergia alimentaria apropiados como el

utilizado en este trabajo para lograr una evaluación integral de la respuesta inmune intestinal.

5. Conclusión

La toxina Cry1Ac administrada por vía intra-gástrica en este modelo murino de alergia alimentaria:

-Es inmunogénica y tiene ligero efecto adyuvante hacia OVA.

-Es moderadamente alergénica comparada con el potencial efecto alergénico inducido por la CT, ya que indujo; reacciones alérgicas moderadas, respuesta de IgE específica, incremento en el número de granulocitos hiperplasia del tejido linfoide en intestino.

-Fue capaz de inducir anafilaxis cuando fue administrada por vía sistémica.

Por lo que consideramos necesario continuar con estudios en los que se evalué el potencial alergénico y las respuestas inmunes intestinales que pudiera provocar el consumo de diversas plantas transgénicas de Bt.

6. Consideraciones

El presente estudio contribuye a proponer parámetros adicionales que no se habían considerado en los modelos de alergia alimentaria tales, como la presencia de hiperplasia del tejido linfoide en colon, la evaluación de los ganglios linfáticos, placas de Peyer y de células IgE+ SiglecF+ de lámina propia intestinal ya que se detectaron exclusivamente elevados en el grupo positivo de alergia OVA/CT y en los grupos inmunizados con la toxina Cry1Ac.

7. Referencias

- [1] A. Bravo, S. Jansens, M. Peferoen, Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects, *J. Invertebr. Pathol.* 60 (1992) 237–246. doi:10.1016/0022-2011(92)90004-N.
- [2] F.S. Betz, B.G. Hammond, R.L. Fuchs, Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests., *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32 (2000) 156–173. doi:10.1006/rtph.2000.1426.
- [3] X. Zhang, M. Candas, N.B. Griko, R. Taussig, L. a Bulla, A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 9897–9902. doi:10.1073/pnas.0604017103.
- [4] N. Rubio-Infante, L. Moreno-Fierros, An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals, *J. Appl. Toxicol.* (2015) n/a-n/a. doi:10.1002/jat.3252.
- [5] C.R. Pigott, D.J. Ellar, Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71 (2007) 255–281. doi:10.1128/MMBR.00034-06.
- [6] Jurat-Fuentes, Bt mode of action, (n.d). <http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html> (accessed June 6, 2018).
- [7] K. Adel-Patient, V.D. Guimaraes, A. Paris, M.-F. Drumare, S. Ah-Leung, P. Lamourette, M.-C. Nevers, C. Canlet, J. Molina, H. Bernard, C. Créminon, J.-M. Wal, Immunological and metabolomic impacts of administration of Cry1Ab protein and MON 810 maize in mouse., *PLoS One.* 6 (2011) e16346. doi:10.1371/journal.pone.0016346.
- [8] A. Finamore, M. Roselli, S. Britti, G. Monastra, R. Ambra, A. Turrini, E. Mengheri, Intestinal and peripheral immune response to MON810 maize ingestion in weaning and old mice, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 11533–11539. doi:10.1021/jf802059w.
- [9] V.D. Guimaraes, M.-F. Drumare, S. Ah-Leung, D. Lereclus, H. Bernard, C. Créminon, J.-M. Wal, K. Adel-Patient, Cry1Ab protein and cholera toxin on allergic sensitisation and elicitation to peanut, *Food Agric. Immunol.* 19 (2008) 325–337.

- doi:10.1080/09540100802495651.
- [10] B. Koul, R. Yadav, I. Sanyal, D.V. Amla, Comparative performance of modified full-length and truncated *Bacillus thuringiensis*-cry1Ac genes in transgenic tomato, *Springerplus*. 4 (2015) 203. doi:10.1186/s40064-015-0991-x.
- [11] P. Liu, X. He, D. Chen, Y. Luo, S. Cao, H. Song, T. Liu, K. Huang, W. Xu, A 90-day subchronic feeding study of genetically modified maize expressing Cry1Ac-M protein in Sprague-Dawley rats, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 3215–3221. doi:10.1016/j.fct.2012.06.009.
- [12] D. Zeljenková, K. Ambrušová, M. Bartušová, A. Kebis, J. Kovřížnych, Z. Krivošíková, M. Kuricová, A. Líšková, E. Rollerová, V. Spustová, E. Szabová, J. Tulinská, S. Wimmerová, M. Levkut, V. Révajová, Z. Ševčíková, K. Schmidt, J. Schmidtke, J.L. La Paz, M. Corujo, M. Pla, G.A. Kleter, E.J. Kok, J. Sharbati, C. Hanisch, R. Einspanier, K. Adel-Patient, J.-M. Wal, A. Spök, A. Pöting, C. Kohl, R. Wilhelm, J. Schiemann, P. Steinberg, Ninety-day oral toxicity studies on two genetically modified maize MON810 varieties in Wistar Han RCC rats (EU 7th Framework Programme project GRACE), *Arch. Toxicol.* 88 (2014) 2289–2314. doi:10.1007/s00204-014-1374-8.
- [13] M. Zhang, Q. Zhuo, Y. Tian, J. Piao, X. Yang, Long-term toxicity study on transgenic rice with Cry1Ac and sck genes, *Food Chem. Toxicol.* 63 (2014) 76–83. doi:10.1016/j.fct.2013.10.035.
- [14] L. Moreno-Fierros, N. García, R. Gutiérrez, R. López-Revilla, R.I. Vázquez-Padrón, Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice, *Microbes Infect.* 2 (2000) 885–890. doi:10.1016/S1286-4579(00)00398-1.
- [15] R.I. Vázquez, L. Moreno-Fierros, L. Neri-Bazán, G. a. De La Riva, R. López-Revilla, *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant, *Scand. J. Immunol.* 49 (1999) 578–584. doi:10.1046/j.1365-3083.1999.00534.x.
- [16] M. Legorreta-Herrera, R. Oviedo Meza, L. Moreno-Fierros, Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of plasmodium -infected CBA/Ca mice, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 (2010).

- doi:10.1155/2010/198921.
- [17] a. Jarillo-Luna, L. Moreno-Fierros, R. Campos-Rodríguez, M. a. Rodríguez-Monroy, E. Lara-Padilla, S. Rojas-Hernández, Intranasal immunization with *Naegleria fowleri* lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion, *Parasite Immunol.* 30 (2008) 31–38. doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00999.x.
- [18] E. González-González, A.L. García-Hernández, R. Flores-Mejía, R. López-Santiago, L. Moreno-Fierros, The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a mouse model, *Vet. Microbiol.* 175 (2015) 382–388. doi:10.1016/j.vetmic.2014.11.021.
- [19] S. Ibarra-Moreno, a. L. García-Hernández, L. Moreno-Fierros, Coadministration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis, *Parasite Immunol.* 36 (2014) 266–270. doi:10.1111/pim.12103.
- [20] G.G. Guerrero, L. Moreno-Fierros, Carrier potential properties of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins for a diphtheria toxin epitope, *Scand. J. Immunol.* 66 (2007) 610–618. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01992.x.
- [21] G.G. Guerrero, D.H. Dean, L. Moreno-Fierros, Structural implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* Cry proteins: role of the N-terminal region., *Mol. Immunol.* 41 (2004) 1177–83. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.026.
- [22] L. Moreno-Fierros, A.L. García-Hernández, D. Ilhuicatzí-Alvarado, L. Rivera-Santiago, M. Torres-Martínez, N. Rubio-Infante, M. Legorreta-Herrera, Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF- α cytokines, *Int. Immunopharmacol.* 17 (2013) 1051–1066. doi:10.1016/j.intimp.2013.10.005.
- [23] N. Rubio-Infante, D. Ilhuicatzí-Alvarado, M. Torres-Martínez, J.P. Reyes-Grajeda, R. Nava-Acosta, E. González-González, L. Moreno-Fierros, The Macrophage Activation Induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protoxin Involves ERK1/2 and p38 Pathways and the Interaction with Cell-Surface-HSP70, *J. Cell. Biochem.* 119 (2018) 580–598. doi:10.1002/jcb.26216.

- [24] R.I. Vazquez-Padron, L. Moreno-Fierros, L. Neri-Bazan, G. a de la Riva, R. Lopez-revilla, G. a De Rival, INTRAGASTRIC AND INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION OF CryIAc PROTOXIN FROM BACILLUS THURINGIENSIS INDUCES SYSTEMIC AND MUCOSAL ANTIBODY RESPONSES IN MICE, *Life Sci.* 64 (1999) 1897–1912. doi:10.1016/S0024-3205(99)00136-8.
- [25] S. Rojas-Hernández, M.A. Rodríguez-Monroy, R. López-Revilla, A.A. Reséndiz-Albor, L. Moreno-Fierros, Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis., *Infect. Immun.* 72 (2004) 4368–4375. doi:10.1128/IAI.72.8.4368-4375.2004.
- [26] M. Torres-Martínez, N. Rubio-Infante, A.L. García-Hernández, R. Nava-Acosta, D. Ilhuicatzí-Alvarado, L. Moreno-Fierros, Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 78 (2016) 106–115. doi:10.1016/j.biocel.2016.06.022.
- [27] M. Andreassen, T. Bohn, O.-G. Wikmark, J. Bodin, T. Traavik, M. Lovik, U.C. Nygaard, Investigations of immunogenic, allergenic and adjuvant properties of Cry1Ab protein after intragastric exposure in a food allergy model in mice., *BMC Immunol.* 17 (2016) 10. doi:10.1186/s12865-016-0148-x.
- [28] S. Wasserman, P. Bégin, W. Watson, IgE-mediated food allergy, *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 14 (2018) 55. doi:10.1186/s13223-018-0284-3.
- [29] M.C. Berin, H.A. Sampson, Mucosal Immunology of Food Allergy, *Curr. Biol.* 23 (2013) R389–R400. doi:10.1016/j.cub.2013.02.043.
- [30] A. Muraro, S. Arasi, Biomarkers in Food Allergy, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 18 (2018) 64. doi:10.1007/s11882-018-0816-4.
- [31] H. Vanheel, M. Vicario, T. Vanuytsel, L. Van Oudenhove, C. Martinez, Á. V Keita, N. Pardon, J. Santos, J.D. Söderholm, J. Tack, R. Farré, Impaired duodenal mucosal integrity and low-grade inflammation in functional dyspepsia, *Gut.* 63 (2014) 262–271. doi:10.1136/gutjnl-2012-303857.
- [32] E.K. Willits, M.A. Park, M.F. Hartz, C.D. Schleck, A.L. Weaver, A.Y. Joshi, Food Allergy: A Comprehensive Population-Based Cohort Study, *Mayo Clin. Proc.* 93 (2018) 1423–1430. doi:10.1016/j.mayocp.2018.05.031.
- [33] C. Perrier, a. C. Thierry, a. Mercenier, B. Corthésy, Allergen-specific antibody

- and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice, *Clin. Exp. Allergy*. 40 (2010) 153–162. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03329.x.
- [34] Y.F. Lam, K.K. Tong, K.M. Kwan, K. Tsuneyama, S.-A. Shu, P.S.C. Leung, K.H. Chu, Gastrointestinal Immune Response to the Shrimp Allergen Tropomyosin: Histological and Immunological Analysis in an Animal Model of Shrimp Tropomyosin Hypersensitivity, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 167 (2015) 29–40. doi:10.1159/000431228.
- [35] C. Kanagaratham, B.F. Sallis, E. Fiebiger, Experimental Models for Studying Food Allergy, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 6 (2018) 356–369.e1. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.05.010.
- [36] S. Rojas-Hernández, M. a. Rodríguez-Monroy, R. López-Revilla, A. a. Reséndiz-Albor, L. Moreno-Fierros, Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, *Infect. Immun.* 72 (2004) 4368–4375. doi:10.1128/IAI.72.8.4368-4375.2004.
- [37] D.J. Vigerust, S. Vick, V.L. Shepherd, Characterization of functional mannose receptor in a continuous hybridoma cell line., *BMC Immunol.* 13 (2012) 51. doi:10.1186/1471-2172-13-51.
- [38] M. Żbikowska-Gotz, K. Pałgan, E. Gawrońska-Ukleja, A. Kuźmiński, M. Przybyszewski, E. Socha, Z. Bartuzi, Expression of IL-17A concentration and effector functions of peripheral blood neutrophils in food allergy hypersensitivity patients., *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 29 (2016) 90–8. doi:10.1177/0394632015617069.
- [39] H.A. Sampson, Update on food allergy☆, *J. Allergy Clin. Immunol.* 113 (2004) 805–819. doi:10.1016/j.jaci.2004.03.014.
- [40] K. Ganeshan, C. V Neilsen, A. Hadsaitong, R.P. Schleimer, X. Luo, P.J. Bryce, Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model., *J. Allergy Clin. Immunol.* 123 (2009) 231–238.e4. doi:10.1016/j.jaci.2008.10.011.
- [41] C.B. Mathias, S. a. Hobson, M. Garcia-Lloret, G. Lawson, D. Poddighe, E.J. Freyschmidt, W. Xing, M.F. Gurish, T. a. Chatila, H.C. Oettgen, IgE-mediated

- systemic anaphylaxis and impaired tolerance to food antigens in mice with enhanced IL-4 receptor signaling, *J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (2011) 795–805. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.009.
- [42] E.B. Brandt, R.T. Strait, D. Hershko, Q. Wang, E.E. Muntel, T. a Scribner, N. Zimmermann, F.D. Finkelman, M.E. Rothenberg, Mast cells are required for experimental oral allergen – induced diarrhea, *J. Clin. Invest.* 112 (2003). doi:10.1172/JCI200319785.Introduction.
- [43] F. Sipos, G. Muzes, Isolated lymphoid follicles in colon: Switch points between inflammation and colorectal cancer?, *World J. Gastroenterol.* 17 (2011) 1666–1673. doi:10.3748/wjg.v17.i13.1666.
- [44] P. Mansueto, G. Iacono, a Seidita, a D’Alcarno, D. Sprini, a Carroccio, Review article: intestinal lymphoid nodular hyperplasia in children - the relationship to food hypersensitivity., *Aliment. Pharmacol. Ther.* (2012) 1000–1009. doi:10.1111/j.1365-2036.2012.05062.x.
- [45] A. Albuquerque, Nodular lymphoid hyperplasia in the gastrointestinal tract in adult patients: A review, *World J. Gastrointest. Endosc.* 6 (2014) 534. doi:10.4253/wjge.v6.i11.534.
- [46] M. Kojima, N. Nakamura, H. Itoh, T. Motoori, K. Hoshi, Y. Enomoto, T. Johshita, H. Nakamine, Histological variety of localized lymphoid hyperplasia of the large intestine: histopathological, immunohistochemical and genotypic findings of 16 cases., *J. Clin. Exp. Hematop.* 49 (2009) 15–21. doi:10.3960/jslrt.49.15.
- [47] R. Troncone, V. Discepolo, Colon in food allergy., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 48 Suppl 2 (2009) S89–S91. doi:10.1097/MPG.0b013e3181a15d1a.
- [48] J. Kokkonen, M. Haapalahti, K. Laurila, T.J. Karttunen, M. Mäki, Cow’s milk protein-sensitive enteropathy at school age., *J. Pediatr.* 139 (2001) 797–803. doi:10.1067/mpd.2001.118882.
- [49] G. Iacono, A. Ravelli, L. Di Prima, C. Scalici, S. Bolognini, S. Chiappa, G. Pirrone, G. Licastri, A. Carroccio, Colonic lymphoid nodular hyperplasia in children: relationship to food hypersensitivity., *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5 (2007) 361–6. doi:10.1016/j.cgh.2006.12.010.
- [50] R.A. Bronen, S.N. Glick, S.K. Teplick, Diffuse lymphoid follicles of the colon associated with colonic carcinoma, *Am. J. Roentgenol.* 142 (1984) 105–109.

- doi:10.2214/ajr.142.1.105.
- [51] R. Nascimbeni, F. Di Fabio, E. Di Betta, P. Mariani, S. Fisogni, V. Villanacci, Morphology of colorectal lymphoid aggregates in cancer, diverticular and inflammatory bowel disease, *Mod. Pathol.* 18 (2005) 681–685. doi:10.1038/modpathol.3800343.
- [52] O. Bernardi, P.M. Dourado, R. a. Carvalho, S. Martinelli, G.U. Berger, G.P. Head, C. Omoto, High levels of biological activity of Cry1Ac protein expressed on MON 87701 × MON 89788 soybean against *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), *Pest Manag. Sci.* 70 (2014) 588–594. doi:10.1002/ps.3581.
- [53] P.J. Kenney, R.E. Koehler, G.D. Shackelford, The clinical significance of large lymphoid follicles of the colon., *Radiology.* 142 (1982) 41–6. doi:10.1148/radiology.142.1.7053546.
- [54] A.C. Piscaglia, L. Laterza, V. Cesario, V. Gerardi, R. Landi, L.R. Lopetuso, G. Calò, G. Fabbretti, M. Brisigotti, M.L. Stefanelli, A. Gasbarrini, Nodular lymphoid hyperplasia: A marker of low-grade inflammation in irritable bowel syndrome?, *World J. Gastroenterol.* 22 (2016) 10198–10209. doi:10.3748/wjg.v22.i46.10198.
- [55] D. Reiner, R.-Y. Lee, G. Dekan, M.M. Epstein, No Adjuvant Effect of *Bacillus thuringiensis*-Maize on Allergic Responses in Mice., *PLoS One.* 9 (2014) e103979. doi:10.1371/journal.pone.0103979.
- [56] H. Li, B. Oppert, K.Y. Zhu, R.A. Higgins, F. Huang, L.L. Buschman, Transgenic plants expressing Bt Delta-endotoxins, *Entomol. Sin.* 1 (2003).
- [57] Y. Devos, A. De Schrijver, P. De Clercq, J. Kiss, J. Romeis, Bt-maize event MON 88017 expressing Cry3Bb1 does not cause harm to non-target organisms., *Transgenic Res.* 21 (2012) 1191–214. doi:10.1007/s11248-012-9617-z.
- [58] I. Ishaaya, S.R. Palli, A.R. Horowitz, *Advanced technologies for managing insect pests*, Springer, 2012.

Apéndice

Figuras suplementarias

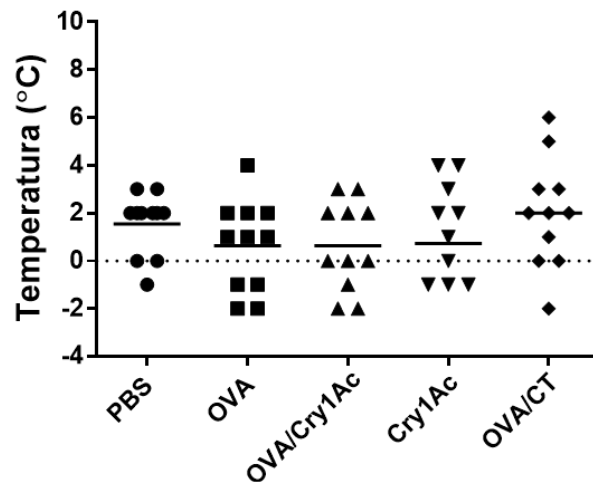


Figura suplementaria 1. Diferencias de temperatura antes y posterior al reto por vía intra-gástrica en ratones BALB/c. Los ratones fueron inmunizados como se describe en materiales y métodos; se evaluó la temperatura de los ratones antes de recibir el reto y 30 min posteriores al reto. La gráfica muestra la diferencia de temperatura observada por grupo en cada ratón. Los resultados mostrados se obtuvieron de experimentos independientes realizados usando 4 ratones por grupo (n = 8 a 12).

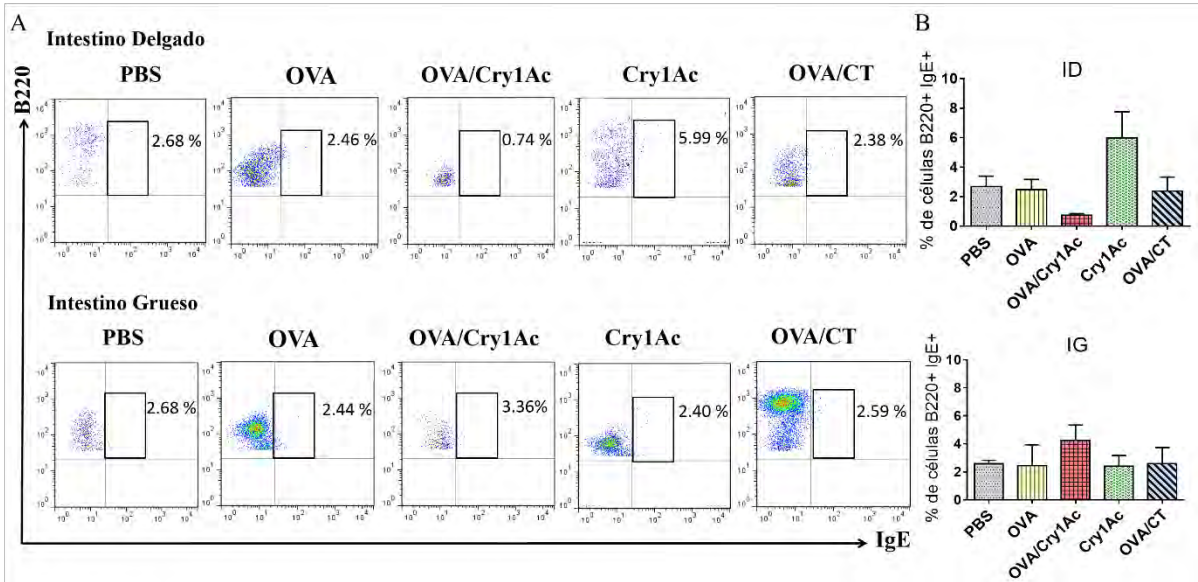
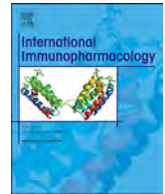


Figura suplementaria 2. Proporción de células B220 + IgE + en lámina propia de intestino. Se obtuvieron células de lámina propia de intestino delgado (ID) e intestino grueso (IG) como se describe en materiales y métodos. Las células se tiñeron con mAbs y se analizaron por citometría de flujo para determinar la proporción de linfocitos B220+ IgE+ (cuadro negro). (B) las gráficas de barras muestran los valores del promedio \pm SEM del porcentaje de linfocitos B220+ IgE+ de cada grupo. Los datos mostrados se obtuvieron de experimentos independientes (n = 8 a 12 ratones por grupo).



Study of the allergenic potential of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin following intra-gastric administration in a murine model of food-allergy

Karla I. Santos-Vigil, Damaris Ilhuicatzi-Alvarado, Ana L. García-Hernández, Juan S. Herrera-García, Leticia Moreno-Fierros*

Laboratorio de Inmunidad en Mucosas, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla 54090, Estado de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Cry1Ac toxin
Intra-gastric administration
Immunogenic
Intestinal lymphoid hyperplasia
Food allergy

ABSTRACT

Cry1Ac toxin, from *Bacillus thuringiensis*, is widely used as a biopesticide and expressed in genetically modified (GM) plants used for human and animal consumption. Since Cry1Ac is also immunogenic and able to activate macrophages, it is crucial to thoroughly evaluate the immunological effects elicited after intra-gastric administration. The allergenic potential of purified Cry1Ac was assessed and compared with that induced in a murine model of food-allergy to ovalbumin (OVA), in which animals are sensitized with the adjuvant Cholera toxin (CT). Mice were weekly intragastrically administered with: i) vehicle phosphate-buffered saline (PBS), ii) OVA, iii) OVA plus CT iv) Cry1Ac or v) OVA plus Cry1Ac. Seven weeks after, mice were intragastrically challenged and allergic reactions along with diverse allergy related immunological parameters were evaluated at systemic and intestinal level. The groups immunized with, Cry1Ac, OVA/Cry1Ac or OVA/CT developed moderate allergic reactions, induced significant IgE response and increased frequencies of intestinal granulocytes, IgE+ eosinophils and IgE+ lymphocytes. These same groups also showed colonic lymphoid hyperplasia, notably in humans, this has been associated with food allergy and intestinal inflammation. Although the adjuvant and allergenic potential of CT were higher than the effects of Cry1Ac, the results show that applied intra-gastrically at 50 µg doses, Cry1Ac is immunogenic, moderately allergenic and able to provoke intestinal lymphoid hyperplasia. Moreover, Cry1Ac is also able to induce anaphylaxis, since when mice were intragastrically sensitized with increasing doses of Cry1Ac, with every dose tested, a significant drop in rectal temperature was recorded after intravenous challenge.

1. Introduction

Cry proteins are produced as proteinaceous crystals during the sporulation phase by *Bacillus thuringiensis* (Bt). These proteins are widely used as biopesticides; also they demonstrate a high solubility, stability in alkaline pH and resistance to proteolysis [1]. After crystal ingestion by susceptible insects, Cry protoxin is solubilized and proteolytically activated by midgut proteases to form a toxic fragment of 65–70 kDa. The activated toxin then binds to specific receptors present on the apical brush border of the midgut epithelium, which provokes formation of a lytic pore, inducing a complex cellular response that disrupts the cell integrity and transepithelial potential difference, ultimately leading to cell lysis and larval death [2,3].

Genetically modified (GM) plants that express the Cry insecticidal toxin as a highly effective means of insect control are currently being produced and a variety of Bt plants have been commercialized in many countries. These plants can express one or several different Cry toxins [3]. Several toxicological studies conducted in animals have evaluated Bt plants; these analyses have included laboratory tests such as, blood chemistry, evaluation of food consumption, body and organ weight and pathological analysis including the presence of tumors. The majority of these studies indicate that GM food containing Cry toxins are safe for human and animal consumption as found no abnormalities in the parameters evaluated, toxicity or death associated with Cry proteins [4–10].

Notwithstanding, the potential adverse immune effects of Cry toxins

Abbreviations: Bt, *Bacillus thuringiensis*; BSA, bovine serum albumin; CT, cholera toxin; Cry1Ac, Cry1Ac toxin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; FCS, fetal calf serum; GM, genetically modified; H&E, hematoxylin and eosin; LI, large intestine; MLN, mesenteric lymphoid node; mAbs, monoclonal antibody; mMCP-1, mouse mast cell protease-1; NLH, nodular lymphoid hyperplasia; IBD, inflammatory bowel disease; CeD, celiac disease; OVA, ovalbumin; PBS, phosphate-buffered saline; PP, Peyer's patch; rpm, revolutions per minute; SI, small intestine

* Corresponding author.

E-mail address: lemofi@unam.mx (L. Moreno-Fierros).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.05.029>

Received 3 May 2018; Received in revised form 25 May 2018; Accepted 29 May 2018

1567-5769/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

is still a public health concern, due to the significant raise in the incidence of allergy and inflammatory bowel diseases recorded particularly in industrialized countries, over the past few decades [11]. Moreover, due to the immunological properties of Cry1Ac proteins, such as mucosal and systemic immunogenicity and adjuvanticity [12–19]; along with its capacity to activate macrophages [20,21], their potential ability to provoke either allergic or inflammatory responses has been suggested, but remains to be proved [22]. Importantly, we have recently demonstrated that Cry1Ac protoxin and toxin are both able to activate macrophages and induce the activation of MAPKs pathways [23,24], further reinforcing the need for a deeper evaluation of their *in vivo* immunological effects in mammals.

A few studies have evaluated the immunogenicity and potential allergenicity of Cry toxins, after intra-gastric administration; these have been centered just in Cry1Ab purified toxin (a protein homologous in structure to Cry1Ac) and in maize MON810 (expressing Cry1Ab). Although some studies have supported its immunogenicity, but not its allergenicity, the approaches employed were limited, such as in the study of Adel et al. 2011 in BALB/c mice, in which was found that intraperitoneal administration of purified toxin and maize MON810 induced serum IgG and IgA production, but did not induce IgE antibody response. However, they did not detect significant serum antibody responses after intra-gastric administration of Cry1Ab, but nor with any of the proteins tested. These negative results may be due to the inadequate immunization scheme used, which consisted on just two administrations with 1 or 100 µg, thus differs considerably from the schemes used in models to evaluate food allergy which include several repeated immunizations. Moreover, the study included neither any analysis of intestinal immune response [4]. In a recent study of Andreassen et al., no evidence of immunogenicity or allergenicity of Cry1Ab was recorded after intra-gastric administrations of low dose of the toxin (10 µg) and intraperitoneal challenges [25], however a comprehensive evaluation of the intestinal immune response was not performed.

In the present study we determined the allergenic potential and immunological effects, of purified Cry1Ac toxin after intra-gastric administration to mice. We selected and adapted an administration scheme similar to that used in mouse models of food allergy to be able to compare the immunological effects of Cry1Ac [26,27]. In this model, mice are intragastrically sensitized to ovalbumin (OVA) in the presence of the Th2-type mucosal adjuvant cholera toxin (CT), or tolerized by intra-gastric administrations of OVA alone; while the antigenic challenge is also administered by intra-gastric route. Thus the model more realistically resembles the antigen entry route occurring in human food allergy, in contrast to other allergy models that use either systemic sensitization or challenges [28]. We performed a wide evaluation of parameters related with intestinal and systemic allergic response such as: i) allergic reactions, ii) specific analysis of IgG1, IgG2a, IgE antibody responses in serum and intestinal lavages, iii) quantification of granulocytes and B220+ IgE+ lymphocytes in spleen, mesenteric lymph node (MLN), Peyer's patches (PP) and intestinal lamina propria cells; iv) analysis of cytokine profiles and v) intestinal histopathological analysis. Overall the results indicate the potential of Cry1Ac toxin to elicit moderate allergy-related responses, when administered via intra-gastric route.

Moreover, Cry1Ac is also able to induce anaphylaxis, as when mice were intragastrically sensitized with increasing doses of Cry1Ac, with every dose tested, a significant drop in rectal temperature was recorded after intravenous challenge further confirming the potential allergenicity of Cry1Ac.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Female BALB/c mice (6–8 week-old) were used throughout this

study. These mice were provided with sterile food (2019 Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet; Harlan Laboratories Inc. Indianapolis, IN) and water *ad libitum*, at the FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México animal house facility in accordance with institutional and national official guidelines (NOM-062-ZOO-1999) for the use and care of laboratory animals. For the majority of the results shown (Figs. 1–5) two to three independent experiments were performed with 4–5 individuals per group, the number (n) of mice used per group is indicated in each figure legend.

2.2. Recombinant Cry1Ac toxin

Recombinant Cry1Ac protoxin was purified from IPTG induced *E. coli* JM103 (Pos900) cultures [29]. Protoxin was solubilized, and the toxin was activated with trypsin as previously described [19]. Endotoxin levels of Cry1Ac toxin were tested using E-toxate kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) and were found to be below 0.1 EU/mL. The protein was then treated with a polymyxin resin (Bio-Rad, Hercules CA, USA) to remove any possible endotoxin remnants, examined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and the total protein concentration was determined by the Bradford method.

2.3. Immunizations

The sensitization protocol used was adapted from a described model to establish food allergy to OVA [26], BALB/c mice of 6–8 weeks old female received intra-gastric administrations. In the allergy positive group mice were sensitized with OVA (Worthington, Lakewood, USA) plus CT (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) while in the negative control tolerized group mice received OVA alone. In this model [26], as in the majority of CT-induced food allergy models high antigen doses are intra-gastrically administered (i.e. 20 mg of OVA), but since our main purpose was to evaluate the allergenicity of Cry1Ac, two distinct doses of OVA (50 µg and 5 mg) were proved in both control groups (OVA alone and OVA plus CT). The lower dose of OVA was initially considered to make it comparable to the dose chosen of Cry1Ac (50 µg). The expected allergy related parameters were attained in the OVA plus CT positive groups, (Supplementary Fig. 1) but these were more marked and consistent with the higher OVA dose than with the lower dose, therefore only the 5 mg dose was used in the subsequent assays.

The groups of mice were intragastrically administered, once a week for seven weeks, using a ball-ended mouse feeding needle, (in 200 µL volumes diluted in PBS) (Fig. 1A), with one of the following treatments: i) vehicle PBS; ii) 50 µg or 5 mg of OVA tolerized control; iii) 50 µg or 5 mg of OVA plus 50 µg of CT as positive allergy control; iv) 50 µg or 5 mg of OVA plus 50 µg of Cry1Ac and v) 50 µg of Cry1Ac alone and v), the last group were test groups used to evaluate if Cry1Ac could induce sensitization to itself respectively to OVA). On day 49, mice received intra-gastric. Challenge with a higher OVA antigen doses, (i.e. 300 µg of OVA for OVA 50 µg groups and 20 mg of OVA for OVA 5 mg groups), or with 300 µg of Cry1Ac (in mice of group Cry1Ac alone). Mice were sacrificed 1 h after the intra-gastric challenge at day 49 (Fig. 1A).

The dose used of 50 µg Cry1Ac was chosen on basis to a dose-response preliminary study in which four distinct doses were tested (10, 50, 100 and 200 µg), to evaluate the immunogenicity via the intra-gastric route, this dose proved to induce significant anti-Cry1Ac serum and intestinal antibody responses using a 3 immunization schedule (Data not show). This dose, also has been previously proved to be immunogenic via intranasal route [19]. The OVA stock solution was also treated with polymyxin resin to remove any possible endotoxin contamination.

2.4. Evaluation of allergic reactions

Allergic reactions were assessed by measuring changes in the body

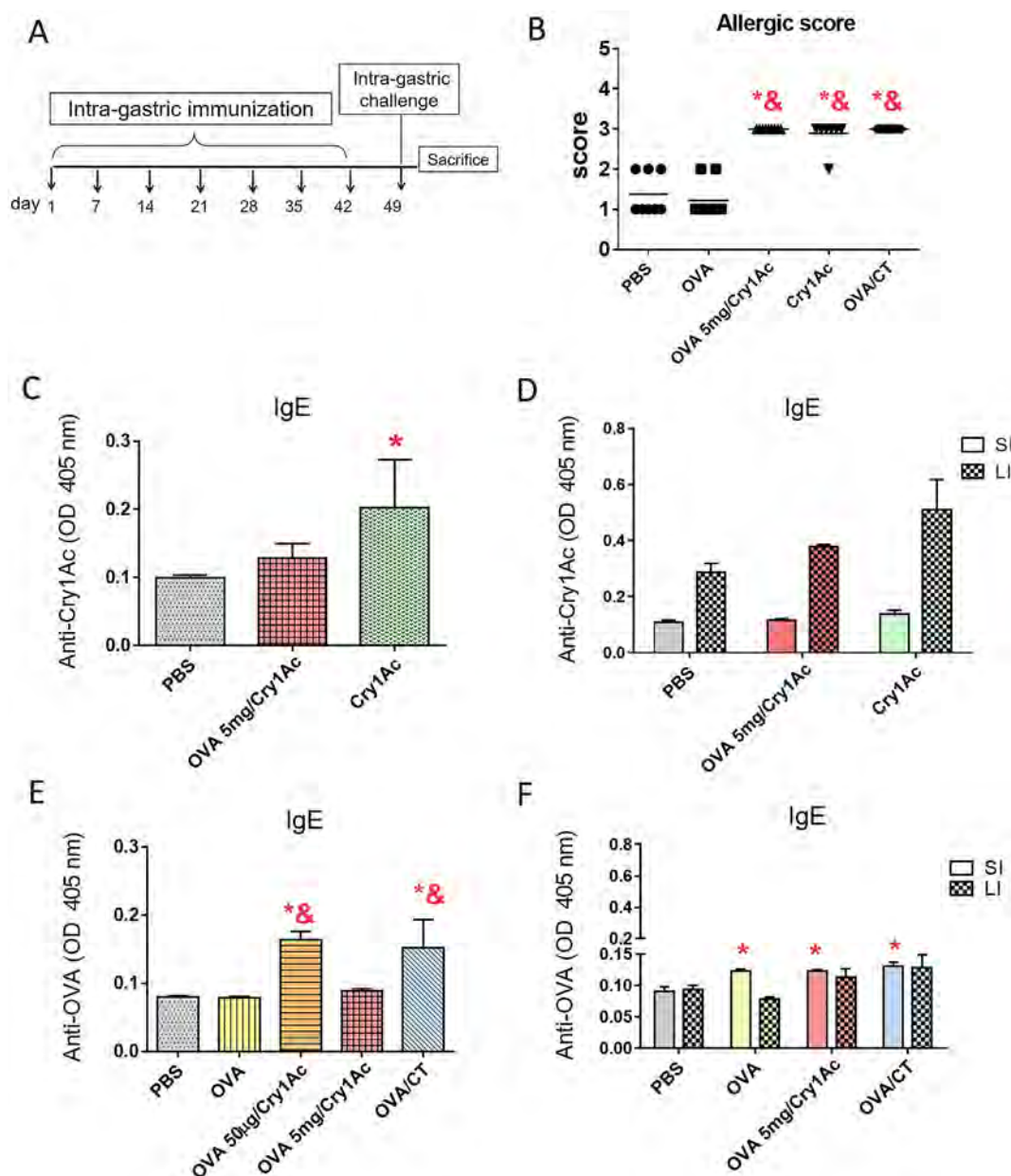


Fig. 1. Protocol of sensitization by intra-gastric route and allergic response. (A) BALB/c mice were intra-gastrically administered once a week for 7 weeks with one of the following treatments: phosphate buffered saline (PBS); ovalbumin (OVA); OVA plus cholera toxin (CT). Cry1Ac alone or OVA plus Cry1Ac. At day 49, mice were challenged intragastrically with OVA or Cry1Ac as detailed in methodology and sacrificed 1 h after. (B) The allergic reactions were determined immediately after intra-gastric challenge, over a 15 min period, based on the following scoring system: 0- no signs; 1- scratching around nose, ears and head less than 10 times in 15 min; 2- scratching 10 times in 15 min; 3- scratching more than 10 times, puffiness around the eyes and mouth, diarrhea, pilar erecti in 15 min; 4- reduced physical activity and/or decreased activity with increased respiratory rate; 5- death. (C) the graphic shows the Cry1Ac-specific IgE antibody response in serum, (D) Cry1Ac-specific IgE antibody response in intestine small intestine (SI) and large intestine LI, (E) shows the response of OVA-specific IgE in serum and (F) response of OVA-specific IgE antibody response in intestine SI (open bars) and LI (close bars). The results shown in A–E were obtained from independent experiments performed using 4 mice per group (n = 8 to 12). Significant differences ($P < 0.05$) are indicated as follows: * versus PBS and & versus OVA.

temperature recorded before and 30 min after the intra-gastric challenge and during 15 min post-challenge the signs of allergic reactions were recorded and monitored in a blinded fashion by two independent researchers. Allergic scores were subsequently graded adhering to an pre-established 0–5 scale [26] consisting of the following signs: 0- no signs; 1- scratching around nose, ears and head less than 10 times for 15 min; 2- scratching 10 times for 15 min; 3- scratching more than 10 times, puffiness around the eyes and mouth, diarrhea, pilar erecti for 15 min; 4- reduced physical activity and/or decreased activity with increased respiratory rate; 5- death.

2.5. Anaphylaxis

Although anaphylaxis can be achieved following intra-gastric challenge to some allergenic proteins such as peanut it is not attained in BALB/C mice sensitized and challenged intra-gastrically to OVA [30], while intravenous challenges protocol had proved to be effective to induce hypothermia shock responses [31]. So, in additional experimental groups one day after receiving an intra-gastric challenge, were carried out intravenous challenges with 100 µg of OVA (in PBS, OVA, OVA plus Cry1Ac and OVA plus CT groups); or with 100 µg of Cry1Ac (in mice intra-gastrically administered with PBS or with increasing

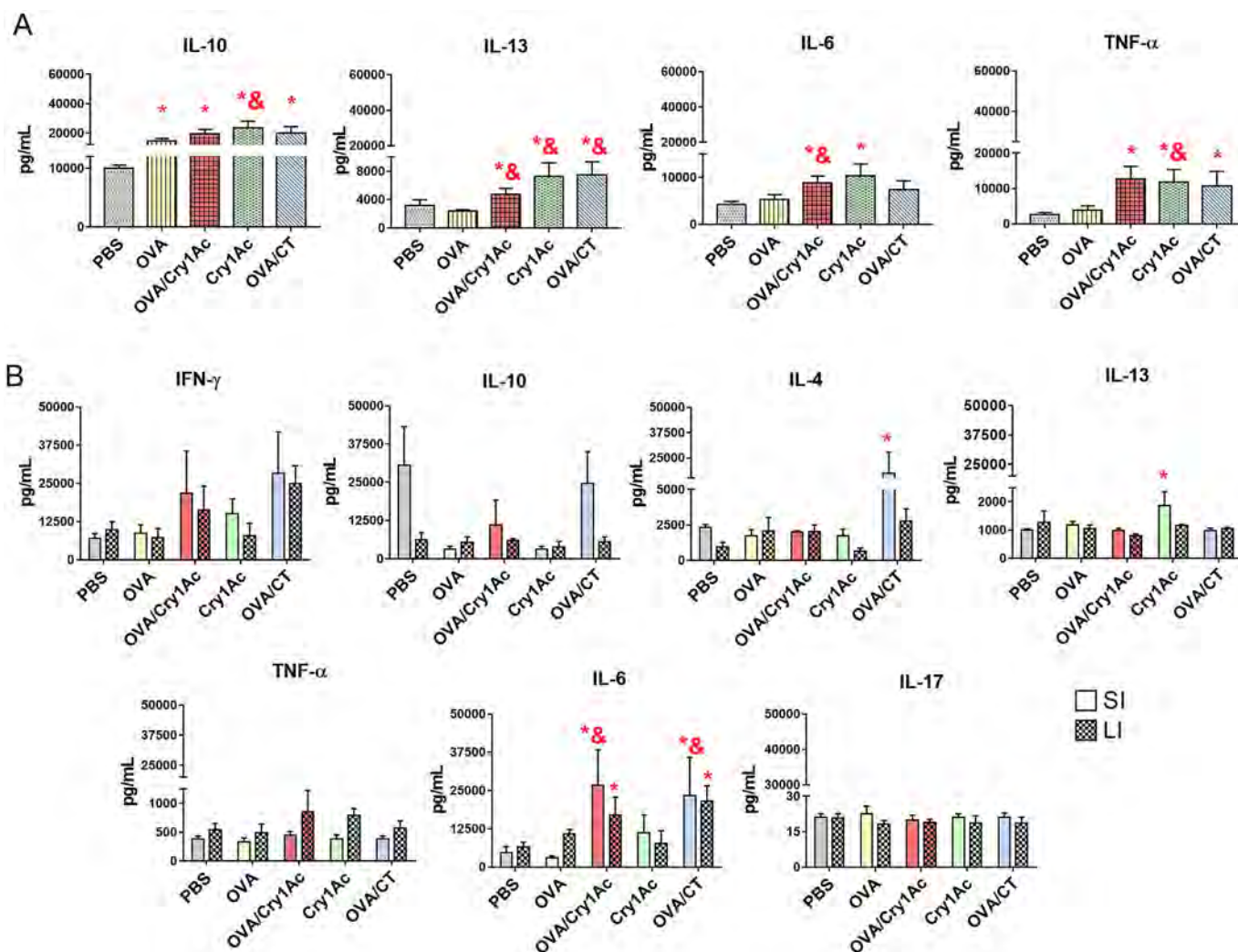


Fig. 2. Intra-gastric administration of Cry1Ac induces a mixed cytokine profile. Cytokines were quantified by ELISA in serum samples (A) IL-10, IL-13, IL-6 and TNF- α cytokines and (B) INF- γ , IL-10, IL-4, IL-13, TNF- α cytokines were quantified in intestinal lavages and represented in the graphics. The results are expressed as mean \pm SEM (n = 8 to 12 mice per group), significant differences ($P < 0.05$) are indicated as follows: * versus PBS and & versus OVA.

doses (10, 50, 100 and 200 μ g) of Cry1Ac (Fig. 5A). Temperature changes were monitored using rectal probe thermometer and significant temperature drop was used as a measure of anaphylaxis.

2.6. Determination of anti-OVA and anti-Cry1Ac antibody levels in serum and intestinal lavages

Serum samples were obtained from blood extracted by cardiac puncture and large intestine (LI) and small intestine (SI) lavages as previously described [32] from sacrificed mice. Anti-OVA and anti-Cry1Ac antibody responses were measured by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Plates were coated overnight at 4 $^{\circ}$ C with 100 μ L of Cry1Ac (10 μ g/mL) or OVA (10 μ g/mL) in carbonate-bicarbonate buffer (0.1 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pH 9.6). Non-specific binding sites were blocked with 0.05% PBS-Tween 20/3% BSA for serum and 0.05% PBS-Tween 20/10% non-fat milk for intestinal lavages samples for 2 h at 4 $^{\circ}$ C. Serial dilutions of samples were incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C in volumes of 100 μ L per well. These started at 1:100 for serum, while for SI and LI lavages were 1:2 diluted with 20% non-fat milk. Peroxidase-conjugated anti-mouse anti-IgG1, anti-IgG2a (Invitrogen, California, USA), and anti-IgA (Life technologies, California, USA) were used at a dilution of 1:1000 and biotinylated anti-mouse anti-IgE (eBioscience, San Diego, USA) used at 1:500. The substrate solution was ABTS 2, 2'-azino-di (3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonate

with H₂O₂ (0.01%). The absorbance was measured at 405 nm using a microplate reader (Biotek ELx 800).

2.7. Spleen, mesenteric lymphoid node and Peyer's patch leukocytes

The Spleen, mesenteric lymphoid node (MLN) and Peyer's patch (PP) were removed and disaggregated through a nylon mesh filter with RPMI-1640 medium supplement with 5% fetal calf serum (FCS) and centrifuged at 1500 rpm for 5 min at 4 $^{\circ}$ C. In spleen, the erythrocytes were lysed with (NH₄Cl 150 mM/l, Tris-HCl 100 Mm pH 7.4) for 5 min, and washed with PBS; the leukocyte pellets were then suspended in 0.5% BSA/PBS and stained with fluorochrome-labeled mAbs as described [24].

2.8. Lamina propria leukocytes

The SI and LI were removed, separated and the lavages were collected. The intraepithelial and lamina propria cells were obtained from both intestines according to a previously published method [32] with some modifications, basically no-percoll gradients were used. After obtaining the intraepithelial cells, the intestines were incubated in an orbital shaker with 20 mL of RPMI-1640 and 60 U/mL of type IV collagenase (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) at 37 $^{\circ}$ C for 30 min at 120 rpm. The intestinal mucosa was then gently compressed and shaken

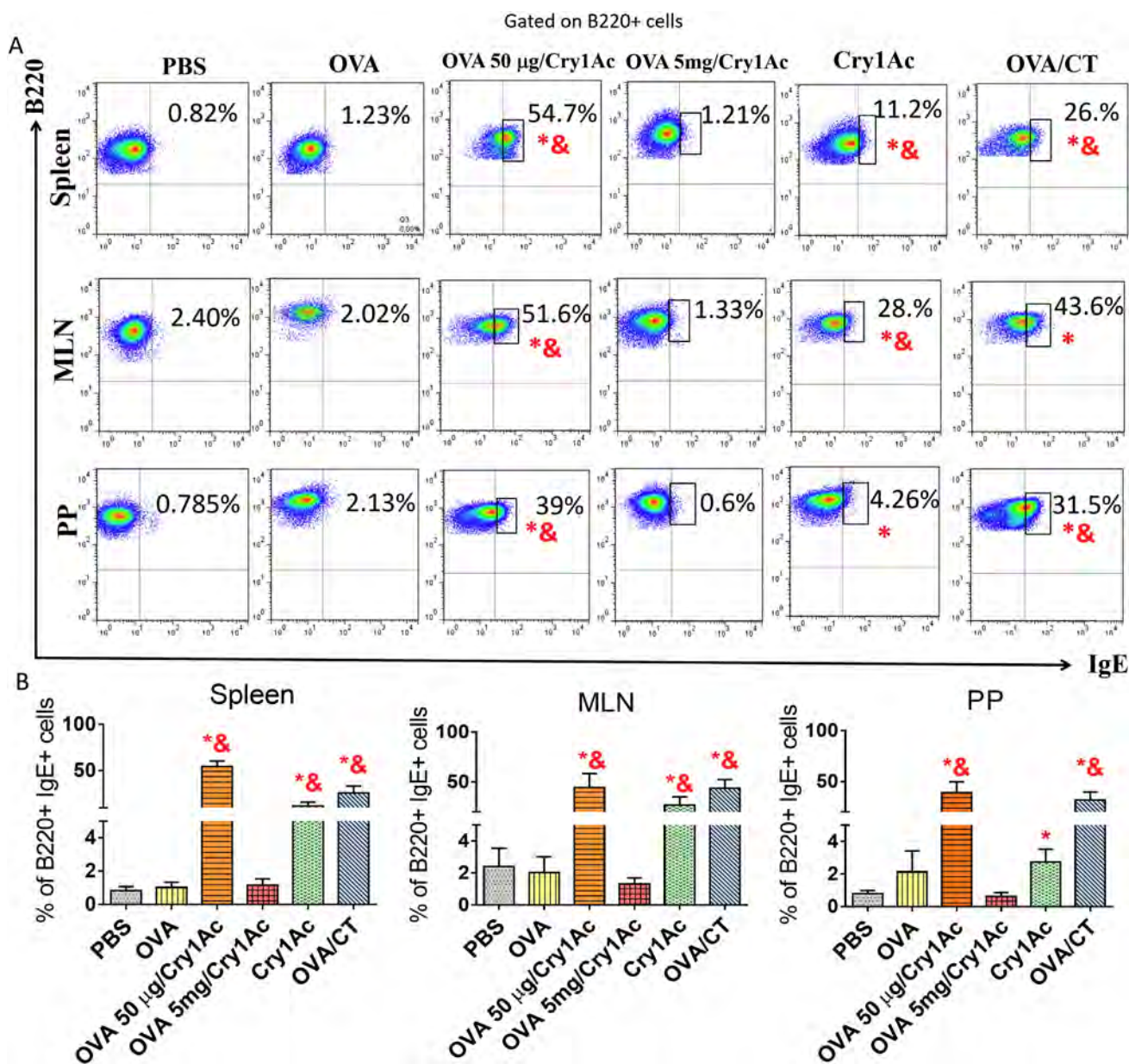


Fig. 3. The Cry1Ac protein increases the proportion of B220+ IgE+ lymphocytes in spleen, mesenteric lymph node and Peyer's patches. Spleen, mesenteric lymph node (MLN) and Peyer's patches (PP) cells were obtained from BALB/c mice, treated as described in Fig. 1. The cells were stained with mAbs and analyzed by flow cytometry to determine the proportion of B220+ IgE+ lymphocytes. (A) Representative dot plots of spleen, MLN and PP cells are shown for each group indicating the percentage of B220+ IgE+ lymphocytes. (B) Bar plots show the mean values \pm SEM of percentage of B220+ IgE+ lymphocytes from each group. Data shown were obtained from independent experiments ($n = 8$ to 12 mice per group). Significant differences ($P < 0.05$) are indicated as follows: * versus PBS and & versus OVA.

to release the loosened cells and single cell suspensions containing lamina propria cells, were filtered, washed with RPMI-1640 medium with 5% fetal bovine serum (FBS) and centrifuged at 1500 rpm for 10 min at 4 °C. Finally, cells were suspended in 0.05% BSA/PBS and stained with fluorochrome labeled mAbs [33].

2.9. Levels of mast cell protease-1 mMCP-1 and cytokines

The mouse mast cell protease-1 (mMCP-1 also abbreviated as MCPT-1) levels were measured using an ELISA kit according to the manufacturer's directions (eBioscience, San Diego, USA) in serum samples 1:2 diluted. The levels of cytokines (IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-13, IL-6, TNF- α) in serum samples and intestinal lavages, were determined by ELISA using commercial kits following the manufacturer's specifications (PEPROTECH, New Jersey, USA). Serum samples were diluted

1:4 and intestinal lavages were diluted 1:2 added in volumes of 100 μ L per well for quantification of cytokines.

2.10. Flow cytometry

The leukocytes obtained from spleen, MLN, PP and the intestinal lamina propria were blocked with antibodies to the Fc γ II/III receptor (anti-CD16/32). Cells were then incubated for 20 min at 4 °C with 25 μ L of the following 1:100 diluted monoclonal antibodies: IgE-FITC (BioLegend, San Diego, USA), B220-PECy5 (eBioscience, San Diego, USA), Siglec-F-PE (eBioscience, San Diego, USA) and Gr1-APC (BioLegend, San Diego, USA). The cells were washed with 0.05% BSA/PBS and suspended in 300 μ L of 1% paraformaldehyde. Relative fluorescence intensities were analyzed using a FACS Calibur cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and BD Cell Quest Pro v.5.1.1

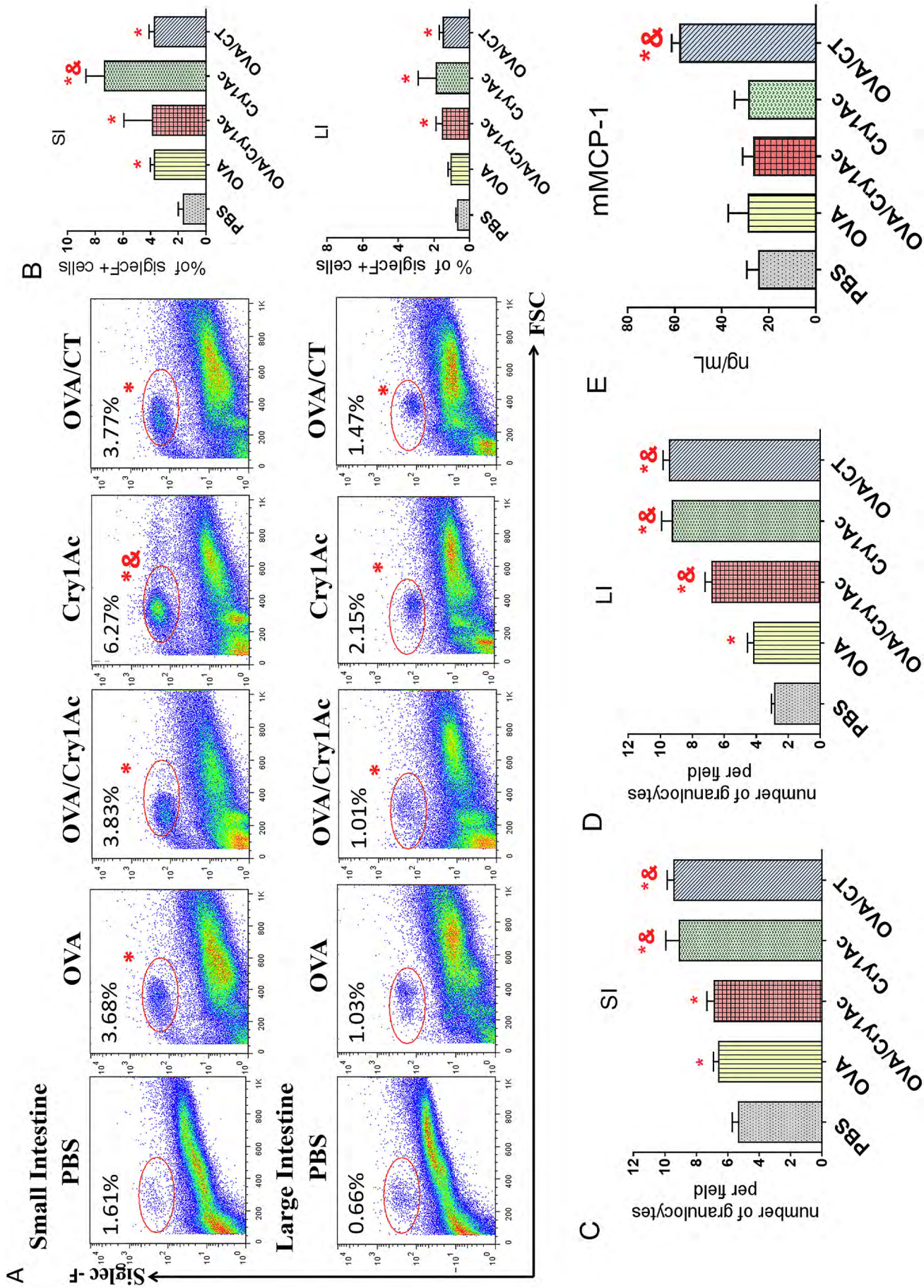


Fig. 4. Analysis of Siglec-F+ cells in lamina propria, granulocytes count in intestine and quantification of mMCP-1 in serum. Mice were treated as indicated in Fig. 1. Lamina propria cells were obtained from SI and LI and stained with mAbs to determine the proportion of Siglec-F+ cells (eosinophils) by flow cytometry. (A) Representative dot plots show the percentage of Siglec-F+ cells (indicated with circles) in each group. (B) Bar plots indicate the mean \pm SEM corresponding to the percentage of Siglec-F+ cells in SI and LI. (C) SI tissue sections and (D) LI tissue sections were labeled with H&E stain and the number of total granulocytes was counted in each section. The graphs show the mean values \pm SEM of the granulocytes count from twenty independent cross-sections (n = 5 mice per group). (E) Concentration of mouse mast cell protease mMCP-1 in serum (n = 8–12 mice per group). Results shown in (B and E) were obtained from independent experiments using 4 mice per group (n = 8–12 mice per group). Significant differences ($P < 0.05$) are indicated as follows: * versus PBS and & versus OVA.

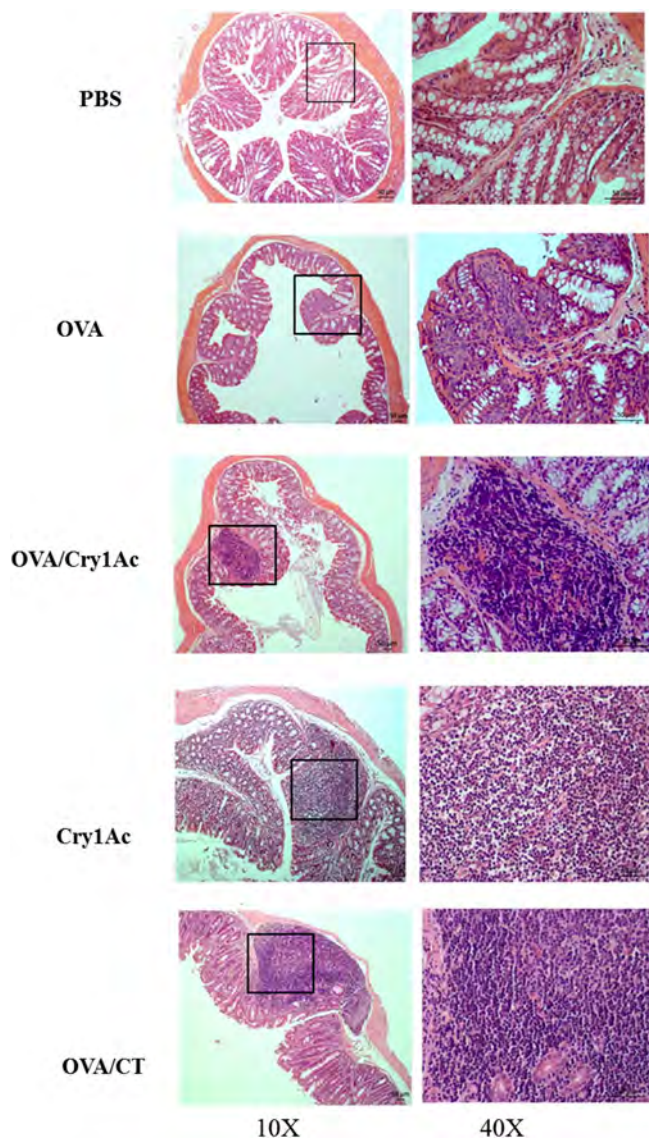


Fig. 5. Treatments with Cry1Ac induces intestinal lymphoid hyperplasia of the colon. Colon sections obtained from BALB/c mice treated as indicated in Fig. 1 were labeled with H&E stain for pathological analysis. The images are representative of colon sections (LI) from each treatment group ($n = 8$ to 12 mice per group). Intestinal lymphoid hyperplasia was induced by OVA/Cry1Ac, Cry1Ac and OVA/CT treatment.

software. One hundred thousand events were recorded; data were analyzed using the FlowJo 7.6 software.

2.11. Histological analysis of intestinal tissues

Intestinal segments 0.5–1 cm long were cut from duodenum, jejunum and ileum of SI and ascending, transverse and colon of LI tissues and were fixed in 4% paraformaldehyde. Tissue slices were dehydrated in graded alcohol and paraffin, cut into 3–6 μm cross-sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Total granulocytes from twenty independent cross-sections per group were counted under a microscope (Axiovert Zeiss, New Orleans, USA) in SI and LI tissue sections. The pathological analysis of intestinal tissue sections was performed by expert pathologist services from the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Aut3noma de M3xico.

2.12. Competition assays of binding of OVA and Cry1Ac to macrophage's cell surface

We performed competitions assays of OVA and Cry1Ac in RAW264.7 macrophages as described [21], cells were pre incubated at 4 $^{\circ}\text{C}$ in binding buffer (PBS with 1% BSA) with the unlabeled Cry1Ac (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or OVA (1 mg/mL) for 30 min on ice. Then the labeled ligand OVA-FITC (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added and the incubation was continued for another 1 h on ice. The samples were fixed and analyzed by flow cytometry.

2.13. Statistical analysis

One-way ANOVA was applied for multiple comparisons, with Kruskal-Wallis post-test used to compare all groups and post comparison Dunn's or Mann Whitney test used to compare all other groups to the control group. All analyses were performed using GraphPad PRISM version 7.0 software. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. The Cry1Ac toxin provokes allergic manifestations

To define the allergenic potential of intra-gastric administration of Cry1Ac, we evaluated the allergic manifestations induced in sensitized mice, as specified in Fig. 1A, immediately after the intra-gastric challenge. In general, similar tolerance-related results were attained with both OVA doses tested, in the OVA alone groups, while in the OVA/CT groups with both OVA doses tested were attained the expected allergy-related responses although at higher magnitude with the higher OVA dose. For this reason, only the results with OVA 5 mg dose are shown for these groups in the Figs. 1–6. However, in the OVA/Cry1Ac groups in general with the higher OVA dose, the Cry1Ac-induced effects were lower than those elicited with the lower dose (50 μg). The results shown in the figures for OVA/Cry1Ac correspond to the OVA 5 mg dose unless other thing is specified.

The treatments with Cry1Ac, OVA/Cry1Ac and OVA/CT (with either of two OVA doses tested) induced mildly allergic manifestations, such as wheezing about mouth, nose and ears more than 10 times, pilar erecti and diarrhea (with score 3; Fig. 1B), while the PBS and OVA groups showed lower allergic manifestations (scores 1 and 2; Fig. 1B) in comparison with the rest of treatments. No significant differences in body temperature were detected between any of the groups (data not shown).

3.2. Cry1Ac treatment induces increased serum specific IgE response

Cry1Ac alone induced a significant increase of anti-Cry1Ac IgE in serum as compared with PBS group (Fig. 1C), while in SI and LI, no significant differences in the levels of anti-Cry1Ac IgE were observed between the treatments (Fig. 1D).

As expected, OVA/CT induced a significant increase of anti-OVA IgE levels in serum (Fig. 1E). However, in the SI only slight and similar anti-OVA IgE responses were detected in OVA/CT (Fig. 1F) and OVA/Cry1Ac treatments, however these responses were similar as those elicited in OVA group but higher with respect to PBS (Fig. 1F). The OVA/Cry1Ac and Cry1Ac groups were able to elicit systemic and mucosal Cry1Ac-specific IgG1, IgG2a and IgA antibody responses (Supplementary Fig. 2). Cry1Ac had a slight systemic adjuvant effect to OVA; however, the magnitude, is not comparable with the strong adjuvant effect of CT in this intestinal allergy model (Supplementary Fig. 3).

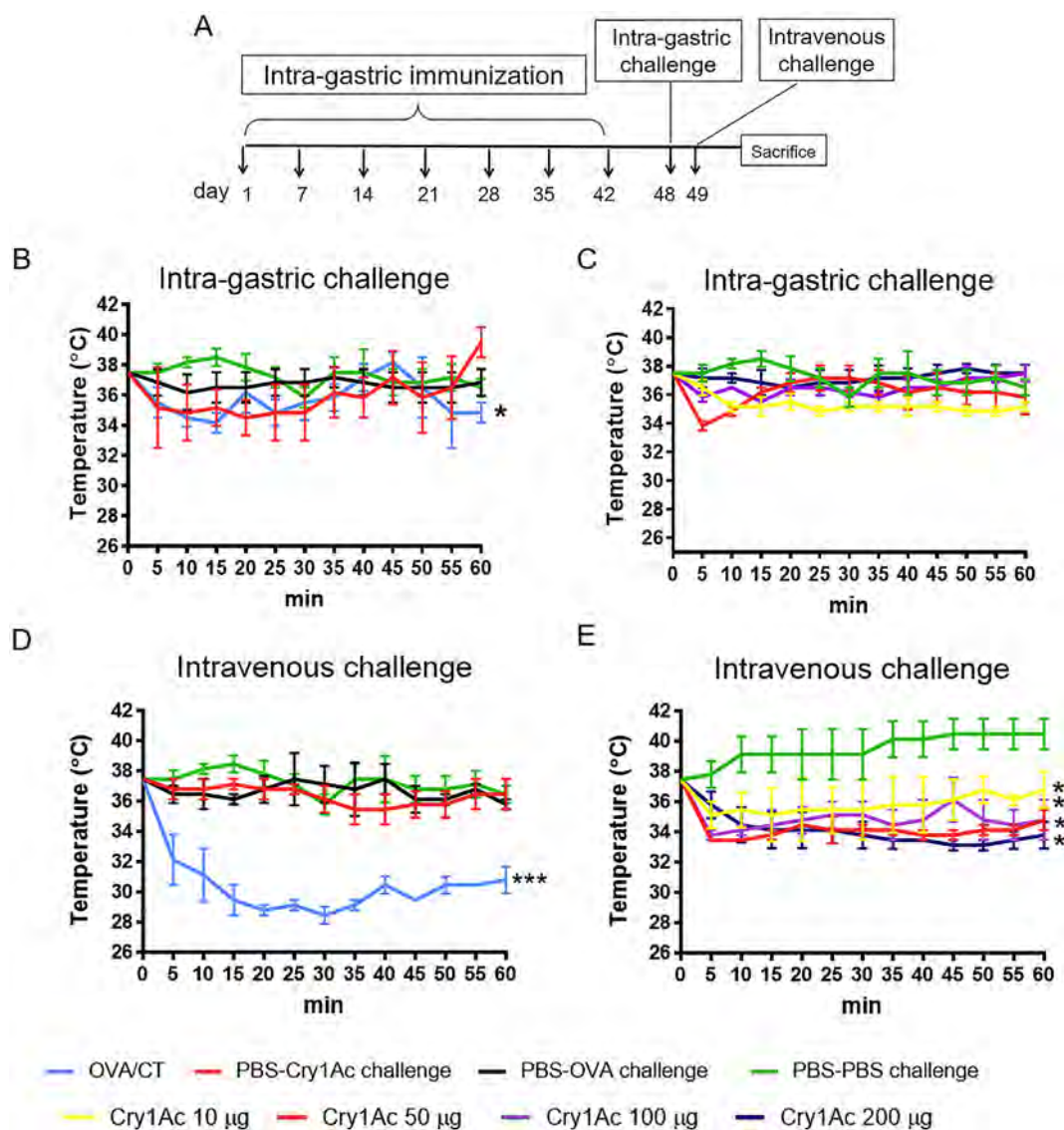


Fig. 6. Intravenous challenge with OVA or Cry1Ac results in anaphylaxis. (A) BALB/c mice were immunized once a week for seven weeks, on 48 day received an intra-gastrically and were assessing the rectal temperature for 1 h as specified in the section materials and methods and one day after (49) the mice received an intravenous antigen challenge with 100 µg of OVA for PBS groups and OVA/CT group, 100 µg of Cry1Ac for PBS group and the different Cry1Ac groups (10, 50, 100 or 200 µg of Cry1Ac). (B) the graph shows the mean of temperature measurement every 5 min after the intra-gastric challenge for 1 h of vehicle groups of PBS and OVA/CT allergy positive control, (C) mean of temperature measurement every 5 min h after the intra-gastric challenge of PBS group and (10, 50, 100 or 200 µg of Cry1Ac) groups, (D) shows the drop of the decrease in temperature assessed every 5 min for 1 h after intravenous challenge of PBS groups and OVA/CT allergy positive control and (E) the graph exhibited the drop of temperature after the intravenous challenge with 100 µg of Cry1Ac for every Cry1Ac group in comparison with the PBS vehicle group. The results shown in A-E were obtained using 3 to 5 mice per group. Significant differences ($P < 0.05$) are indicated as follows * versus PBS challenge (OVA); *** versus PBS challenge with (Cry1Ac, OVA, PBS) and * versus PBS challenge (PBS).

3.3. The intra-gastric administration of Cry1Ac induce a mixed cytokine profile

In general, a slightly increased mixed cytokine profile was detected in serum and in intestinal lavages of Cry1Ac, OVA/CT and OVA/Cry1Ac groups with respect to the PBS and OVA groups.

In serum the cytokine profile detected with significant increase were IL-10, IL-13, IL-6 and TNF α , (Fig. 2A) in Cry1Ac group, OVA/Cry1Ac and OVA/CT in comparison with PBS vehicle group. The cytokines were also evaluated in intestinal lavages, where a low mixed cytokine profile was observed in all groups, however only a slightly increased IL-6 level was detected in the OVA/CT and Cry1Ac groups (Fig. 2B). The difficulty in detecting intestinal cytokines, in this model of food allergy to OVA, may be due to the low levels induced or to their lability since in the OVA/CT group no substantial levels were detected either.

3.4. Cry1Ac treatment significantly increases the proportion of B220 + IgE + lymphocytes in spleen, mesenteric lymph node and Peyer's patches

The IgE antibody was also evaluated by flow cytometry, assessing the frequency of B220 + IgE + lymphocytes in cells from spleen, MLN, PP and lamina propria.

In spleen cells, Cry1Ac alone induced a considerable increase in the percentage of B220 + IgE + lymphocytes ($11.24\% \pm 3.72$) with respect to PBS ($0.82\% \pm 0.25$) and OVA ($1.23\% \pm 0.47$); while OVA/CT ($26.05\% \pm 3.24$) also exhibited an increase in this population ($P < 0.05$) (Fig. 3A, B). OVA/Cry1Ac also increased the proportion of B220 + IgE + lymphocytes but only with the 50 µg OVA dose ($54.7\% \pm 6.5$).

In MLN, Cry1Ac treatment elicited a significantly higher proportion of B220 + IgE + lymphocytes ($27.1\% \pm 8.57$) than was induced in PBS

Table 1

Histopathological changes recorded in the intestines of mice intra-gastrically administered. The histopathological changes recorded in sections of small intestine (SI) and large intestine (LI) of every group treated as described in materials and methods were marked as (+) positive or (–) negative when were present or absent in at least 70% of mice. Some observations are indicated in negative marked groups when histopathological changes were recorded in some individuals. The data summarize observations recorded in tissue sections from 9 mice per group.

	PBS	OVA	OVA/Cry1Ac	Cry1Ac	OVA/CT
SI					
Lymphoplasmacytic enteritis	(+) Mild, focal	(+) Mild, multifocal	(+) Mild, multifocal/diffuse	(+) Mild/moderate, diffuse/ multifocal	(+) Mild/moderate, diffuse
Goblet cell hyperplasia	(–)	(–)	(+) Mild/moderate/severe, diffuse	(+) Mild/moderate, multifocal	(+) Mild/moderate, diffuse
Lymphoid tissue hyperplasia	(–)	(–)	(+) Mild/moderate, focal	(+) Severe, focal	(+) Mild/moderate/severe, focal
Edema	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)
Lymphangiectasia	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)
Epithelial shedding	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)
LI					
Lymphoplasmacytic enteritis	(–) Absent or mild, focal	(–) Absent or mild focal	(+) Mild, multifocal	(+) Mild, multifocal	(+) Mild, multifocal/diffuse
Goblet cell hyperplasia	(–) Absent or mild, focal	(–) Absent or Mild focal	(+) Mild/moderate multifocal	(+) Mild/moderate multifocal/ diffuse	(+) Mild/moderate diffuse
Lymphoid tissue hyperplasia	(–) Absent	(–) Absent or mild focal	(+) Mild/moderate, focal/ multifocal	(+) Mild/moderate, focal	(+) Mild/moderate to severe, focal
Edema	(–)	(–) Absent or mild diffuse	(+) Moderate, diffuse	(+) Mild, diffuse	(+) Moderate, diffuse
Lymphangiectasia	(–)	(–)	(–)	(+)	(+)
Epithelial shedding	(–)	(–)	(–)	(+)	(+)

(2.40% \pm 1.45) and OVA (9.17% \pm 4.10). OVA/Cry1Ac treatment also increased this population with the lower OVA dose 50 μ g (51.60% \pm 20.1) but not with the high OVA dose 5 mg (1.33% \pm 1.12). While OVA/CT (43.65% \pm 12.65) also increased these population ($P < 0.05$) (Fig. 3A–B).

The percentage of B220+ IgE+ lymphocytes in PP was significantly increased in Cry1Ac (4.26% \pm 1.46) in comparison to PBS (0.785% \pm 0.21) and in OVA/Cry1Ac (39% \pm 12.30) the increase was higher than every other group, but only with the low dose of OVA, while in OVA/CT was significantly increased (6.77% \pm 3.72) with respect to PBS (0.78% \pm 0.21) and OVA (2.13% \pm 1.35) ($P < 0.05$) (Fig. 3A, B). In lamina propria cells of SI and LI, no significant changes in the cell population of B220+ IgE+ lymphocytes were detected between groups (data not shown).

3.5. The administration of Cry1Ac increases the number of eosinophils and total granulocytes in intestine

Eosinophils were analyzed by flow cytometry with Siglec-F mAb. In lamina propria cells of SI, the percentage of Siglec-F+ cells of OVA (3.68% \pm 0.52), OVA/Cry1Ac (3.83% \pm 0.52), Cry1Ac (6.27% \pm 1.77), and OVA/CT (3.77% \pm 0.44) treatments was significantly higher than in PBS (1.61% \pm 0.42) groups (Fig. 4A–B). In the LI, OVA/CT (1.47% \pm 0.25) showed a significant increase with respect to PBS (0.66% \pm 0.10) in the percentage of Siglec-F+ cells, while a no significant increase was observed in the percentage of Siglec-F+ cells in OVA/Cry1Ac (1.01% \pm 0.14) and Cry1Ac (2.15% \pm 1.26) in LI ($P < 0.05$) (Fig. 4A, B).

The number of total granulocytes was also counted by microscopy in sections of SI and colon LI. The number of granulocytes per field was significantly increased in SI sections from OVA (6.56 \pm 0.40), OVA/Cry1Ac (6.86 \pm 0.46), Cry1Ac (9.08 \pm 0.86) and OVA/CT (9.41 \pm 0.44) compared to the PBS group (5.31 \pm 0.35) ($P < 0.05$) (Fig. 4C). Likewise, in LI sections, the number of granulocytes per field were considerably increased in the OVA/Cry1Ac (6.76 \pm 0.44) Cry1Ac (9.25 \pm 0.68) and OVA/CT (9.41 \pm 0.41) groups compared to the

PBS (2.85 \pm 0.20) and OVA (4.16 \pm 0.38) groups ($P < 0.05$) (Fig. 4D).

3.6. The Cry1Ac toxin does not induce an increase in the mMCP-1 levels in serum

It is well known that when IgE bound to its receptor (FcεRI) cross-link with allergens on mast cells, the mast cells suffer degranulation, releasing histamine, leukotrienes and proteases and provoking allergic symptoms. We measured the levels of mMCP-1, a mouse mast cell protease-1 and β -chymase because it is considered a typical allergic mediator released during mast cell degranulation [34] [35]. Only the OVA/CT (positive allergy control) treatment significantly increased the mMCP-1 levels in serum with respect to the rest of the groups (Fig. 4E). While OVA/Cry1Ac and Cry1Ac treatments showed mMCP-1 levels very similar to the PBS and OVA groups (Fig. 4E).

3.7. Intra-gastric administration of Cry1Ac induces lymphoid intestinal hyperplasia in colon

Histological analysis was performed in order to determine whether the intra-gastric administration of the different treatments induced pathological changes in tissues of intestine. In intestinal sections of control mice immunized with PBS and OVA the normal intestinal morphology was preserved. In contrast, in LI from mice treated with OVA/Cry1Ac, Cry1Ac or OVA/CT, intestinal lymphoid tissue hyperplasia was observed especially in the colon (Fig. 5). The cellular infiltrate in this hyperplasia appears to be formed by lymphocytes, and no inflammatory infiltrate of macrophages, eosinophils or neutrophils was observed inside in the H&E stained preparations. To determine whether the lymphoid hyperplasia was reversible once the immunizations were suspended, the intestinal histological analysis was done, in additional groups of mice which received the 8-week sensitization scheme, but were sacrificed until one month after. The histological analysis revealed that the presence intestinal hyperplasia persisted in the OVA/Cry1Ac, Cry1Ac or OVA/CT groups (data no shown).

In addition to the referred lymphoid hyperplasia in colon other

histopathological changes was identified in intestine, such as lymphoplasmocytic enteritis, goblet cell hyperplasia, edema, and epithelial shedding, were also recorded in particularly in the intestines (SI and LI) sections of OVA/CT, Cry1Ac and OVA/Cry1Ac groups (Table 1). In general, these alterations were more severe in the OVA/CT group than in the other groups.

3.8. The intravenous challenge with Cry1Ac provokes anaphylaxis

The mildly allergenic responses recorded in the groups sensitized with Cry1Ac by intra-gastric route led us to prove whether this toxin may provoke anaphylaxis if was administered at higher doses (Fig. 6C). After intra-gastric challenge only in the OVA/CT group was recorded a slight temperature drop (Fig. 6B). However, a limitation of the oral sensitization food allergy model selected, is that symptoms of anaphylaxis are not achieved upon food gavage [31], so we performed intravenous antigen challenge with OVA or with Cry1Ac in additional groups (Fig. 6A). Remarkably, in mice intragastrically sensitized with every dose tested of Cry1Ac (10, 50, 100 or 200 µg) a significant temperature drop was recorded after the intravenous challenge with Cry1Ac (Fig. 6E). This drop was observed since the first minutes and maintained during 35 min, while no significant temperature drops were recorded after intra-gastric challenges with Cry1Ac (Fig. 6C). While a marked temperature drop was observed after intravenous challenge with OVA in OVA/CT allergy positive control (Fig. 6D). This drop was more pronounced than the one elicited with Cry1Ac further reinforcing the higher allergenic potential of CT. As expected, nor intra-gastric neither intravenous challenges with OVA, Cry1Ac or PBS provoked significant changes in temperature in PBS group (Fig. 6B,D).

3.9. The binding OVA to macrophage's cell surface is competed by Cry1Ac

A possible explanation to the lower effect Cry1Ac induced with the 5 mg OVA dose, with respect to the 50 µg dose in the OVA/Cry1Ac treatments, which was recorded for some allergy parameters (i.e. increase in B220+ IgE+ and IgE+ Siglec-F+ cells) could be that OVA and Cry1Ac were competing with a common receptor. The preliminary results performed in macrophages support this possibility as the binding of OVA-FITC to the cell surface was partially inhibited by an excess of Cry1Ac (Supplementary Fig. 4). Considering that OVA is known to be endocytosed in macrophages through the mannose receptor further studies are still required to determine whether Cry1Ac use this same receptor. It will also be important to determine if OVA could block some of the Cry1Ac-induced activation effects on macrophages [24,36].

4. Discussion

Overall, the results indicate that Cry1Ac toxin via intra-gastric route has the capability to generate moderate allergy-related immune responses. As, we found the groups administered with Cry1Ac and OVA/Cry1Ac, but particularly the Cry1Ac alone group, elicited some allergy-related manifestations, that were comparable in magnitude to those induced by the allergy positive control (OVA/CT treatment). For example: moderate score (level 3) of systemic allergic reactions, increased proportion IgE+ cells in spleen, MLN and PP, increased proportion of granulocytes in the intestinal lamina propria and intestinal tissue, and generation of colonic lymphoid hyperplasia. However, the mucosal adjuvant effect of CT, measured by the increase on the specific antibody responses towards co-administered antigen OVA, was much greater than the slight adjuvant effect of Cry1Ac elicited by intra-gastric route. Also, the increases in Mmcp-1 levels and magnitude of temperature drop following intravenous challenge were more pronounced in the OVA/CT than in the Cry1Ac groups indicating a lower potential of Cry1Ac to promote allergy and anaphylaxis with respect to CT.

The mildly allergic manifestations elicited in present study by treatments with Cry1Ac and OVA/CT were similar to those recorded in

the comparable murine model of food allergy to OVA established by Perrier et al. [26] Likewise, mildly allergy manifestations such as cramps and scarring of skin are observed in patients with food allergy [37].

Our results indicate that Cry1Ac toxin is immunogenic when administered by intra-gastric route as OVA/Cry1Ac and Cry1Ac treatments induced systemic and mucosal antibody responses (Supplementary Fig. 3). Likewise, we have previously reported the immunogenicity of Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1Aa and Cry3A toxins but following administration by intranasal and intraperitoneal routes, using a scheme consisting in 3 weekly immunizations [19]. The adjuvant capacity of Cry1Ac by intra-gastric route is slight, as by the coadministration of OVA with Cry1Ac only were induced significant OVA-specific IgG1 and IgA antibody responses in serum (Supplementary Fig. 4); and these responses were much lower than those induced in the OVA/CT group, thus as expected CT clearly exhibited a potent systemic and mucosal adjuvant effect similar to the reported in other studies [26,27,38].

By flow cytometry and microscopy, we found that the numbers of eosinophils were significantly increased in the gut of the positive allergy control OVA/CT, as well as in OVA/Cry1Ac and Cry1Ac groups. Similar to our results, the increase in the number of eosinophils numbers has been observed in the blood in several food allergy models using adjuvants [39]. Also in a study of Zeljenková et al. [9] assessing the effect of feeding rats with 11% or 33% GM maize that express Cry1Ab toxin (MON810) for 5 and 14 weeks were found increased numbers of eosinophils in blood, but they did not perform any examination of allergy related parameters at the intestines. In addition, they found that rats fed GM maize presented some signs of hepatorenal toxicity; however, they concluded that MON810 was as safe as conventional varieties of corn.

In most studies in which the biosafety of GM Bt plants has been tested, the possible changes or damages that Cry toxins could provoke in organs such as the intestine are not microscopically evaluated. For this reason, we performed histological analysis of intestinal tissue. The main change observed in OVA/Cry1Ac, Cry1Ac and OVA/CT treated groups was a lymphoid intestinal hyperplasia recorded in LI sections. The presence of colon lymphoid hyperplasia is a parameter that had not been described associated with food allergy in murine models, according to present results we propose that it should be considered as it.

In humans, isolated lymphoid follicles are normally found throughout the intestines but their presence is known to be increased in the caecum and rectum regions. However, a high density of lymphoid follicles might imply a pathological condition. Besides, under inflammatory conditions, the number, diameter and density of isolated lymphoid follicles is increased [40]. Some studies have detected nodular lymphoid intestinal hyperplasia associated with *Giardia* infection, *H. pylori* infection and with immune deficiency status such as IgA deficiency. In most of these cases, the lymphoid hyperplasia was observed in SI [41,42]. Whereas, coinciding with our findings, intestinal lymphoid hyperplasia of the colon is more commonly related to food allergy in children and adults [43,44]. Likewise, some studies have consistently demonstrated an association between food allergy and lymphoid hyperplasia in colon, because the number of patients without colonic lymphoid hyperplasia that had food allergy was much lower than those presenting it [45,46].

In addition to its association with food allergy, the presence of nodular lymphoid hyperplasia (NLH) has been also linked with inflammatory bowel disease (IBD), celiac disease (CeD), lymphoma, colonic carcinoma [47–51] and has been proposed as a marker of low-grade inflammation in inflammatory bowel disease. In children NLH are considered parapsychological aggregates, as they are regularly asymptomatic and reversible. Conversely, although little is known about the clinical implications of NLH in adults, considering the risk of malignant transformation the endoscopic surveillance of these structures has been recommended [42]. On basis of present results showing lymphoid

colonic hyperplasia induced by intra-gastric administration of Cry1Ac, we consider important to perform further studies to determine whether the ingestion of Cry toxins may be associated with an increased presence of nodular lymphoid hyperplasia in humans, as these structures appear to be related with food allergy and/or with intestinal inflammatory conditions.

Our present results demonstrating the potential of Cry1Ac to induce responses linked with food allergy differ from the effects reported with Cry1Ab toxin using an experimental allergic asthma or disease relapse model induced with OVA, as they did not observe allergic manifestations. In the study of Reiner et al. [52] mice consumed approximately 19 µg per day of Cry1Ab toxin, as they were fed with a diet including 33% Bt maize containing approximately 0.0013% of Cry1Ab during 32 or 34 days. The different results may be due to the distinct Cry1A protein tested, by the distinct schedule, different allergy model used and distinct dose. However, the authors argued that the absence of allergic response could be due to the denaturation of Cry1Ab during food processing.

Likewise, in a recent study of Andreassen et al. [25] was found no evidence of Cry1Ab toxin immunogenicity or allergenicity to the allergen lupin in mice, after repeated intra-gastric administrations of low doses of Cry1Ab (10 µg) and intraperitoneal challenges. However, in their positive allergy group coadministered with CT neither were detected significant specific antibody responses, nor changes in serum cytokines. These different results could also be explained by the differences in sequence between Cry1Ab and Cry1Ac, or to the different doses and routes of administration used, as well as by the differences derived from the modification of native cry gene sequences done to increase the effectivity in a GM Bt plants [53,54]. So further detailed studies are required in which the immunogenicity and allergenicity of these similar Cry1A proteins are compared in appropriate conditions to determine this apparent distinct allergenic potential.

Despite our results contrast to other studies, finding no evidence of immunogenicity nor allergenicity for Cry1Ab, those were performed without considering the evaluation of allergy-related intestinal parameters or using low doses of antigen or a reduced number of immunizations. Thus the appropriate use of antigen doses, immunization schedule, food-allergy model and the analysis intestinal parameters appear to be critical factors to precisely evaluate the immunogenicity and allergenicity of Cry proteins via intra-gastric route. With the dose of 50 µg protein/25 g mouse we were able to observe the immunogenicity and moderate allergenic potential of Cry1Ac in a food allergy mouse model, extrapolating these data to a 70 kg person, 140 mg should be the dose required to induce immunogenic effects. These levels could not be easily achieved by consumption of some GM plants in which the expression levels of Cry proteins had been estimated to be very low (i.e. 0.0013% of protein content in MON810 maize [52]), however there are wide variations in measurements of Cry concentrations in plant material [55] and in other transgenic plants such as broccoli, much higher expression levels of Cry proteins had been achieved (i.e. 0.4% of total protein). Besides, it is important to mention that the expression levels of Cry proteins in plants can differ considerably [55]. Considering these aspects, the dose required to observe an immunostimulating or allergenic effect due to Cry1Ac could be achieved by ingestion of a much lower amount of GM plant than was originally thought.

It is important to note that in this study we used a native purified Cry1Ac toxin, while the proteins expressed in transgenic plants are modified or truncated, so as a result of these modifications they may have different immunological properties. We also recommend, the need to perform such further evaluation of the allergenicity of each transgenic plant using appropriate food allergy models like the one used in this work, as well as to accomplish an integral evaluation of the intestinal immune response.

5. Conclusion

Cry1Ac has the potential capability to provoke, related allergy changes when administered by intra-gastric route. In addition, present study contributes to propose additional parameters that had not been considered in food allergy models such as the presence of colonic lymphoid hyperplasia, assessing the lymph nodes and Peyer's patches and of IgE + SiglecF+ cells intestinal lamina propria; as they were exclusively detected elevated in the allergy positive group (OVA/CT) and in the Cry1Ac groups.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.05.029>.

Funding

This work was supported by UNAM PAPIIT (IN219013, IN219416), UNAM PAPCA (2016-28) and CONACYT (CB177612, CB 283319), México.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest or financial conflicts.

Acknowledgements

Karla Ivette Santos-Vigil is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas from UNAM and is a CONACYT doctoral fellow.

References

- [1] A. Bravo, S. Jansens, M. Peferoen, Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects, *J. Invertebr. Pathol.* 60 (1992) 237–246, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(92\)90004-N](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(92)90004-N).
- [2] X. Zhang, M. Candas, N.B. Griko, R. Taussig, L.A. Bulla, A mechanism of cell death involving an adenyllyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 9897–9902, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0604017103>.
- [3] F.S. Betz, B.G. Hammond, R.L. Fuchs, Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32 (2000) 156–173, <http://dx.doi.org/10.1006/rtp.2000.1426>.
- [4] K. Adel-Patient, V.D. Guimaraes, A. Paris, M.-F. Drumare, S. Ah-Leung, P. Lamourette, M.-C. Nevers, C. Canlet, J. Molina, H. Bernard, C. Créminon, J.-M. Wal, Immunological and metabolic impacts of administration of Cry1Ab protein and MON 810 maize in mouse, *PLoS One* 6 (2011) e16346, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016346>.
- [5] A. Finamore, M. Roselli, S. Britti, G. Monastera, R. Ambra, A. Turrini, E. Mengheri, Intestinal and peripheral immune response to MON810 maize ingestion in weaning and old mice, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 11533–11539, <http://dx.doi.org/10.1021/jf802059w>.
- [6] V.D. Guimaraes, M.-F. Drumare, S. Ah-Leung, D. Lereclus, H. Bernard, C. Créminon, J.-M. Wal, K. Adel-Patient, Cry1Ab protein and cholera toxin on allergic sensitization and elicitation to peanut, *Food Agric. Immunol.* 19 (2008) 325–337, <http://dx.doi.org/10.1080/09540100802495651>.
- [7] B. Koul, R. Yadav, I. Sanyal, D.V. Amla, Comparative performance of modified full-length and truncated *Bacillus thuringiensis*-cry1Ac genes in transgenic tomato, *Springerplus* 4 (2015) 203, <http://dx.doi.org/10.1186/s40064-015-0991-x>.
- [8] P. Liu, X. He, D. Chen, Y. Luo, S. Cao, H. Song, T. Liu, K. Huang, W. Xu, A 90-day subchronic feeding study of genetically modified maize expressing Cry1Ac-M protein in Sprague-Dawley rats, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 3215–3221, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.009>.
- [9] D. Zeljenková, K. Ambrušová, M. Bartušová, A. Kebis, J. Kovřížnych, Z. Krivošíková, M. Kuricová, A. Lišková, E. Rollerová, V. Spustová, E. Szabová, J. Tulinská, S. Wimmerová, M. Levkut, V. Révájová, Z. Ševčíková, K. Schmidt, J. Schmidtko, J.L. La Paz, M. Corujo, M. Pla, G.A. Kleter, E.J. Kok, J. Sharbati, C. Hanisch, R. Einspanier, K. Adel-Patient, J.-M. Wal, A. Spök, A. Pötting, C. Kohl, R. Wilhelm, J. Schiemann, P. Steinberg, Ninety-day oral toxicity studies on two genetically modified maize MON810 varieties in Wistar Han RCC rats (EU 7th Framework Programme project GRACE), *Arch. Toxicol.* 88 (2014) 2289–2314, <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-014-1374-8>.
- [10] M. Zhang, Q. Zhuo, Y. Tian, J. Piao, X. Yang, Long-term toxicity study on transgenic rice with Cry1Ac and sck genes, *Food Chem. Toxicol.* 63 (2014) 76–83, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.035>.
- [11] D.S. Kotlyar, M. Shum, J. Hsieh, W. Blonski, D.A. Greenwald, Non-pulmonary allergic diseases and inflammatory bowel disease: a qualitative review, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 11023–11032, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i32>.

- 11023.
- [12] L. Moreno-Fierros, N. García, R. Gutiérrez, R. López-Revilla, R.I. Vázquez-Padrón, Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice, *Microbes Infect.* 2 (2000) 885–890, [http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00398-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00398-1).
- [13] R.I. Vázquez, L. Moreno-Fierros, L. Neri-Bazán, G.A. De La Riva, R. López-Revilla, *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant, *Scand. J. Immunol.* 49 (1999) 578–584, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3083.1999.00534.x>.
- [14] M. Legorreta-Herrera, R. Oviedo Meza, L. Moreno-Fierros, Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of plasmodium -infected CBA/Ca mice, *J Biomed Biotechnol* 2010 (2010), <http://dx.doi.org/10.1155/2010/198921>.
- [15] A. Jarillo-Luna, L. Moreno-Fierros, R. Campos-Rodríguez, M.A. Rodríguez-Monroy, E. Lara-Padilla, S. Rojas-Hernández, Intranasal immunization with *Naegleria fowleri* lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion, *Parasite Immunol.* 30 (2008) 31–38, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00999.x>.
- [16] E. González-González, A.L. García-Hernández, R. Flores-Mejía, R. López-Santiago, L. Moreno-Fierros, The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a mouse model, *Vet. Microbiol.* 175 (2015) 382–388, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.021>.
- [17] S. Ibarra-Moreno, A.L. García-Hernández, L. Moreno-Fierros, Coadministration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis, *Parasite Immunol.* 36 (2014) 266–270, <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12103>.
- [18] G.G. Guerrero, L. Moreno-Fierros, Carrier potential properties of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins for a diphtheria toxin epitope, *Scand. J. Immunol.* 66 (2007) 610–618, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01992.x>.
- [19] G.G. Guerrero, D.H. Dean, L. Moreno-Fierros, Structural implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* cry proteins: role of the N-terminal region, *Mol. Immunol.* 41 (2004) 1177–1183, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.026>.
- [20] L. Moreno-Fierros, A.L. García-Hernández, D. Ilhuicatzí-Alvarado, L. Rivera-Santiago, M. Torres-Martínez, N. Rubio-Infante, M. Legorreta-Herrera, Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF- α cytokines, *Int. Immunopharmacol.* 17 (2013) 1051–1066, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.10.005>.
- [21] N. Rubio-Infante, D. Ilhuicatzí-Alvarado, M. Torres-Martínez, J.P. Reyes-Grajeda, R. Nava-Acosta, E. González-González, L. Moreno-Fierros, The macrophage activation induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin involves ERK1/2 and p38 pathways and the interaction with cell-surface-HSP70, *J. Cell. Biochem.* 119 (2018) 580–598, <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.26216>.
- [22] N. Rubio-Infante, L. Moreno-Fierros, An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals, *J. Appl. Toxicol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3252> (n/a-n/a).
- [23] L. Moreno-Fierros, A.L. García-Hernández, D. Ilhuicatzí-Alvarado, L. Rivera-Santiago, M. Torres-Martínez, N. Rubio-Infante, M. Legorreta-Herrera, Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF- α cytokines, *Int. Immunopharmacol.* 17 (2013) 1051–1066, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.10.005>.
- [24] M. Torres-Martínez, N. Rubio-Infante, A.L. García-Hernández, R. Nava-Acosta, D. Ilhuicatzí-Alvarado, L. Moreno-Fierros, Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 78 (2016) 106–115, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.06.022>.
- [25] M. Andreassen, T. Bohn, O.-G. Wikmark, J. Bodin, T. Traavik, M. Lovik, U.C. Nygaard, Investigations of immunogenic, allergenic and adjuvant properties of Cry1Ab protein after intragastric exposure in a food allergy model in mice, *BMC Immunol.* 17 (2016) 10, <http://dx.doi.org/10.1186/s12865-016-0148-x>.
- [26] C. Perrier, A.C. Thierry, A. Mercenier, B. Corthésy, Allergen-specific antibody and cytokine responses, mast cell reactivity and intestinal permeability upon oral challenge of sensitized and tolerized mice, *Clin. Exp. Allergy* 40 (2010) 153–162, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03329.x>.
- [27] K. Ganeshan, C.V. Neilsen, A. Hadsaitong, R.P. Schleimer, X. Luo, P.J. Bryce, Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model, *J. Allergy Clin. Immunol.* 123 (2009), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2008.10.011> (231–238.e4).
- [28] M. Chehade, L. Mayer, Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities, *J. Allergy Clin. Immunol.* 115 (2005) 3–12, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2004.11.008> (quiz 13).
- [29] S. Rojas-Hernández, M.A. Rodríguez-Monroy, R. López-Revilla, A.A. Reséndiz-Albor, L. Moreno-Fierros, Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, *Infect. Immun.* 72 (2004) 4368–4375, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.8.4368-4375.2004>.
- [30] J.L. Van Gramberg, M.J. de Veer, R.E. O'Hehir, E.N.T. Meeusen, R.J. Bischof, Use of animal models to investigate major allergens associated with food allergy, *J Allergy Ther* 2013 (2013) 635695, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/635695>.
- [31] L.M. Bartnikas, M.F. Gurish, O.T. Burton, S. Leisten, E. Janssen, H.C. Oettgen, J. Beaupré, C.N. Lewis, K.F. Austen, S. Schulte, J.L. Hornick, R.S. Geha, M.K. Oyoshi, Epicutaneous sensitization results in IgE-dependent intestinal mast cell expansion and food-induced anaphylaxis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 131 (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.11.032> (451–60.e1–6).
- [32] S.L. Verdin-Terán, A. Vilches-Flores, L. Moreno-Fierros, Immunization with Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* increases intestinal IgG response and induces the expression of FcRn in the intestinal epithelium of adult mice, *Scand. J. Immunol.* 70 (2009) 596–607, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02332.x>.
- [33] A.A. Reséndiz-Albor, R. Esquivel, R. López-Revilla, L. Verdín, L. Moreno-Fierros, Striking phenotypic and functional differences in lamina propria lymphocytes from the large and small intestine of mice, *Life Sci.* 76 (2005) 2783–2803, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2004.08.042>.
- [34] S.J. Galli, M. Tsai, A.M. Piliponsky, The development of allergic inflammation, *Nature* 454 (2008) 445–454, <http://dx.doi.org/10.1038/nature07204>.
- [35] M.-Y. Chung, H.S. Shin, D.W. Choi, D.-H. Shon, Citrus Tachibana leaf extract mitigates symptoms of food allergy by inhibiting Th2-associated responses, *J. Food Sci.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13315>.
- [36] D.J. Vigerust, S. Vick, V.L. Shepherd, Characterization of functional mannose receptor in a continuous hybridoma cell line, *BMC Immunol.* 13 (2012) 51, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2172-13-51>.
- [37] H.A. Sampson, Update on food allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 113 (2004) 805–819, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2004.03.014>.
- [38] C.B. Mathias, S.A. Hobson, M. Garcia-Lloret, G. Lawson, D. Poddighe, E.J. Freyschmidt, W. Xing, M.F. Gurish, T.A. Chatila, H.C. Oettgen, IgE-mediated systemic anaphylaxis and impaired tolerance to food antigens in mice with enhanced IL-4 receptor signaling, *J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (2011) 795–805, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.009>.
- [39] E.B. Brandt, R.T. Strait, D. Hershko, Q. Wang, E.E. Muntel, T.A. Scribner, N. Zimmermann, F.D. Finkelmann, M.E. Rothenberg, Mast cells are required for experimental oral allergen – induced diarrhea, *J. Clin. Invest.* 112 (2003), <http://dx.doi.org/10.1172/JCI200319785.Introduction>.
- [40] F. Sipes, G. Muzes, Isolated lymphoid follicles in colon: switch points between inflammation and colorectal cancer? *World J. Gastroenterol.* 17 (2011) 1666–1673, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v17.i13.1666>.
- [41] P. Mansueti, G. Iacono, A. Seidita, A. D'Alcamo, D. Sprini, A. Carroccio, Review article: intestinal lymphoid nodular hyperplasia in children — the relationship to food hypersensitivity, *Aliment. Pharmacol. Ther.* (2012) 1000–1009, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05062.x>.
- [42] A. Albuquerque, Nodular lymphoid hyperplasia in the gastrointestinal tract in adult patients: a review, *World J. Gastrointest. Endosc.* 6 (2014) 534, <http://dx.doi.org/10.4253/wjge.v6.i11.534>.
- [43] M. Kojima, N. Nakamura, H. Itoh, T. Motoori, K. Hoshi, Y. Enomoto, T. Johshita, H. Nakamine, Histological variety of localized lymphoid hyperplasia of the large intestine: histopathological, immunohistochemical and genotypic findings of 16 cases, *J. Clin. Exp. Hematop.* 49 (2009) 15–21, <http://dx.doi.org/10.3960/jslr.49.15>.
- [44] R. Troncone, V. Discepolo, Colon in food allergy, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 48 (Suppl 2) (2009) S89–S91, <http://dx.doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a15d1a>.
- [45] J. Kokkonen, M. Haapalahti, K. Laurila, T.J. Karttunen, M. Mäki, Cow's milk protein-sensitive enteropathy at school age, *J. Pediatr.* 139 (2001) 797–803, <http://dx.doi.org/10.1067/mpd.2001.118882>.
- [46] G. Iacono, A. Ravelli, L. Di Prima, C. Scalici, S. Bolognini, S. Chiappa, G. Pirrone, G. Licastri, A. Carroccio, Colonic lymphoid nodular hyperplasia in children: relationship to food hypersensitivity, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5 (2007) 361–366, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2006.12.010>.
- [47] R.A. Bronen, S.N. Glick, S.K. Teplick, Diffuse lymphoid follicles of the colon associated with colonic carcinoma, *Am. J. Roentgenol.* 142 (1984) 105–109, <http://dx.doi.org/10.2214/ajr.142.1.105>.
- [48] R. Nascimbeni, F. Di Fabio, E. Di Betta, P. Mariani, S. Fisogni, V. Villanacci, Morphology of colorectal lymphoid aggregates in cancer, diverticular and inflammatory bowel disease, *Mod. Pathol.* 18 (2005) 681–685, <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3800343>.
- [49] O. Bernardi, P.M. Dourado, R.A. Carvalho, S. Martinelli, G.U. Berger, G.P. Head, C. Omoto, High levels of biological activity of Cry1Ac protein expressed on MON 87701 \times MON 89788 soybean against *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), *Pest Manag. Sci.* 70 (2014) 588–594, <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3581>.
- [50] P.J. Kenney, R.E. Koehler, G.D. Shackelford, The clinical significance of large lymphoid follicles of the colon, *Radiology* 142 (1982) 41–46, <http://dx.doi.org/10.1148/radiology.142.1.7053546>.
- [51] A.C. Piscaglia, L. Laterza, V. Cesario, V. Gerardi, R. Landi, L.R. Lopetuso, G. Calò, G. Fabbretti, M. Brisigotti, M.L. Stefanelli, A. Gasbarrini, Nodular lymphoid hyperplasia: a marker of low-grade inflammation in irritable bowel syndrome? *World J. Gastroenterol.* 22 (2016) 10198–10209, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i46.10198>.
- [52] D. Reiner, R.-Y. Lee, G. Dekan, M.M. Epstein, No adjuvant effect of bacillus thuringiensis-maize on allergic responses in mice, *PLoS One* 9 (2014) e103979, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103979>.
- [53] H. Li, B. Oppert, K.Y. Zhu, R.A. Higgins, F. Huang, L.L. Buschman, Transgenic plants expressing Bt delta-endotoxins, *Entomol. Sin.* (2003) 1.
- [54] Y. Devos, A. De Schrijver, P. De Clercq, J. Kiss, J. Romeis, Bt-maize event MON 88017 expressing Cry3Bb1 does not cause harm to non-target organisms, *Transgenic Res.* 21 (2012) 1191–1214, <http://dx.doi.org/10.1007/s11248-012-9617-z>.
- [55] I. Ishaaya, S.R. Palli, A.R. Horowitz, *Advanced Technologies for Managing Insect Pests*, Springer, 2012.