



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**IMPACTO DEL CONSUMO ORAL DE TOXINA CRY1Ac EN
LA RESPUESTA INFLAMATORIA DEL INTESTINO
GRUESO. UN ENFOQUE COMPARATIVO CON RESPECTO
A UN MODELO MURINO DE INFLAMACIÓN INTESTINAL.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA**

PRESENTA:

Ximena Ilbet Betanzos Laguna

Directores de tesis:

**DRA. LETICIA MORENO FIERROS.
MTRA. DAMARIS ILHUICATZI ALVARADO.**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, noviembre
2023**



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 instituciones

A la Universidad Nacional Autónoma de México en donde, desde mi primer día como estudiante de esta casa de estudios me sentí en mi segunda casa, y quien me cobijo de conocimiento y enseñanzas.

Mi agradecimiento especial a la técnica académica Damaris, cuya orientación y apoyo inquebrantable han sido mi faro en este viaje.

Asimismo, extendiendo mi gratitud a mi comité revisor, compuesto por el Dr. Alexander Pedroza González, la Dra. Araceli Pérez López y el Dr. Jonadab Efraín Olguín Hernández. Sus valiosos y enriquecedores comentarios, así como el tiempo y la dedicación que brindaron a la revisión de mi trabajo, han sido esenciales para elevar la calidad de esta tesis.

Esta tesis fue financiada por los proyectos:

UNAM PAPIIT IN202923

UNAM PAPCA-2022-20

Apoyo para ayudante de investigador nivel III

Agradecimientos personales

Esta tesis es, en cierto modo, un tributo al vasto conocimiento que he adquirido a lo largo de mi educación académica.

A mi madre, Iliana, por ser mi compañera de vida y por su apoyo constante desde que era demasiado pequeña para comprenderlo plenamente.

A mi fiel compañera, Coneja, quien ha sido mi silenciosa confidente y ha estado a mi lado durante los largos días de estudio previos al examen de licenciatura, a lo largo de mi carrera y, más recientemente, durante la escritura de estas páginas. A William, por ser un cachorro que nos ha alegrado la vida.

A la M. en C. Damaris Alvarado, quien con paciencia me ha guiado para alcanzar los objetivos de este proyecto. A día de hoy, la considero como mi hermana mayor en el ámbito académico.

A la Dra. Moreno, cuya sabiduría permea cada rincón de nuestro laboratorio.

A mis amigos de carrera en quienes encontré verdaderos compañeros, A Mariel, Alberto quien me pasaba la tarea, a Julio Daniela y en especial a Daniel Farfán, quien fue mi primer amigo en la universidad. Gracias por estar siempre presente, por ser tan aventurero y estudiar conmigo para los exámenes.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi pequeña familia, compuesta por mi madre, mi fiel compañera, Coneja, y al más reciente miembro, William. Su amor, apoyo y presencia constante han sido mi fuente de inspiración y fortaleza a lo largo de este viaje académico.

Índice

Agradecimientos	2
Agradecimientos personales	3
Dedicatoria	4
Índice.....	5
Lista de abreviaturas	7
Resumen	8
Introducción	9
Las toxinas insecticidas Cry.....	9
Estructura de la toxina Cry1Ac.....	11
Panorama actual de los Organismos Genéticamente Modificados.....	12
Limitaciones de los Estudios Toxicológicos de las Proteínas Cry1Ac.	13
El Papel del Sistema Inmune en la Regulación del Intestino Grueso	14
Incidencia de enfermedades inflamatorias intestinales en la actualidad y su alteración en la respuesta inmune intestinal	16
Antecedentes	17
Justificación.....	19
Hipótesis	19
Objetivo general.....	19
Objetivos particulares	19
Metodología.....	21
Selección de las dosis evaluadas.....	21
Extracción y purificación de las proteínas toxina Cry1Ac.....	22
Administración intragástrica de Toxina Cry1Ac.....	22
Esquema de inducción de inflamación intestinal con DSS (control positivo).....	22
Evaluación de los parámetros físicos asociados a enfermedades inflamatorias intestinales.	22
Obtención de explantes de colon y ciego para cuantificación de citocinas.	23
Cuantificación de citocinas por método de ELISA.....	23
Análisis histológicos.....	24
Obtención de células de la lámina propia para análisis por citometría de flujo.	24
Citometría de flujo	24
Análisis estadístico.	25

Resultados	26
Extracción y purificación de la toxina Cry1Ac	26
Parámetros físicos de la inflamación	26
Cuantificación de citocinas en sobrenadante de explantes de colon.	27
Cuantificación de citocinas en sobrenadante de ciego.	28
Expresión de citocinas en suero sanguíneo	29
Análisis histopatológico en colon, tras la administración intragástrica de toxina Cry1Ac	30
Comparación de la respuesta inflamatoria en células CD11b+ entre la toxina Cry1Ac y el control positivo con DSS	33
Evaluación de la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en células CD11b+.	35
Análisis de CCR2 en células de lámina propia.	37
Identificación de neutrófilos con Ly6G en colon.	39
Administración intragástrica de la toxina Cry1Ac: efectos sobre la población de células CD19+ y CD3+ en la lámina propia del intestino.	40
Discusión	42
Conclusiones	46
Referencias	47

Lista de abreviaturas

Bt: *Bacillus thuringiensis*

CPA: Células presentadoras de antígeno

CU: Colitis ulcerativa

DSS: Dextran sulfato de sodio

H&E: Hematoxilina y Eosina

IBD: Inflammatory bowel disease (enfermedades inflamatorias intestinales)

IG: Intestino grueso

IL-10: Interleucina 10

IL-1 β : Interleucina 1Beta

IL-6: Interleucina 6

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

MAPK's: Proteínas cinasas activadas por mitógeno

MF: Fagocitos mononucleares

MHC-II: Complejo principal de histocompatibilidad clase II

M Φ : Macrófago

OGM: Organismos genéticamente modificados

PBA: Amortiguador de fosfato salino con albúmina sérica bovina

PBS: Amortiguador de fosfato salino

SBF: Suero bovino fetal

SFN: Suero bovino neonatal

TNF- α : Factor de necrosis tumoral Alpha

Resumen

La toxina Cry1Ac, derivada de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, se emplea ampliamente como biopesticida en organismos genéticamente modificados (OGM), especialmente en plantas destinadas al consumo humano y animal.

La TCry1Ac ha sido previamente reconocida como un inmunógeno altamente efectivo, debido a su capacidad para estimular una respuesta inmune al activar células inmunológicas, especialmente los macrófagos, que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. A pesar de esto, aún no se ha realizado un estudio exhaustivo de los posibles efectos a nivel intestinal de los alimentos que contienen estas proteínas. Por tanto, resulta esencial investigar detenidamente los impactos potenciales de la TCry1Ac en el entorno intestinal.

Por otro lado, se ha observado un aumento en la incidencia de enfermedades inflamatorias intestinales (IBDs) en paralelo con la creciente utilización y consumo de alimentos transgénicos que expresan la toxina Cry1Ac. Por tanto, es esencial examinar si el consumo de TCry1Ac puede inducir una respuesta inflamatoria intestinal que podría influir en el desarrollo de una IBDs.

En esta tesis, hemos evaluado el posible efecto proinflamatorio intestinal de la TCry1Ac, mediante un enfoque agudo, comparándolo con un modelo de inflamación intestinal inducida por DSS al 3%. Administrando tres dosis diferentes de la toxina Cry1Ac (2 µg, 20 µg y 50 µg) por vía intragástrica en ratones C57BL/6, hemos evaluado signos potencialmente asociados a IBDs, como la presencia de sangre en heces, cambios en el peso corporal, acortamiento del intestino grueso y alteraciones histopatológicas. Además, hemos medido los niveles de citocinas tanto en suero como en tejido intestinal, y hemos analizado diferentes tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos y linfocitos, en dos segmentos del intestino grueso: el ciego y el colon.

Nuestros hallazgos indican que la administración intragástrica de TCry1Ac en un modelo agudo no ha dado lugar a la aparición de signos relacionados con la inflamación intestinal, en comparación con el grupo de control positivo, que mostró acortamiento intestinal, pérdida de peso, aumento de neutrófilos, aumento de células CD11b+ y cambios histológicos. Sin embargo, hemos observado un cambio significativo en la expresión de la citocina IL-10 en el intestino grueso, acompañado de hiperplasias linfoides leves a moderadas. No obstante, se requerirá una evaluación más exhaustiva para comprender plenamente el impacto de la exposición crónica y determinar si, bajo condiciones crónicas, esta administración sigue siendo segura.

Introducción

Las toxinas insecticidas Cry

Bacillus thuringiensis (*Bt*), fue descrita en 1901. Se trata de una bacteria Grampositiva edáfica, anaeróbica facultativa que se caracteriza por la producción de cuerpos paraesporales, que son formas insolubles de inclusiones cristalinas compuestas de protoxinas, conocidos como proteínas Cry o δ -endotoxinas (Whiteley & Schnepf, 1986). Se han utilizado a nivel mundial en el control de insectos plaga importantes para la producción de cultivos agrícolas o que son vectores de enfermedades humanas. (Mendoza-Almanza et al., 2020)

Las proteínas Cry de *B. thuringiensis* representan más de 500 toxinas relacionadas filogenéticamente con variadas actividades entomopatógenas. Cada una de estas toxinas Cry son altamente específicas. Su citotoxicidad incluye larvas de las principales plagas de la agricultura, tales como Lepidóptera (mariposas y polillas), Díptera (moscas y mosquitos) Coleóptera (escarabajos), así como, así como nematodos, ácaros y protozoos. (Xu, Wang, & Sun, 2014)

La proteína Cry1Ac (Figura 1) se produce como una protoxina de 135 kDa durante la fase de esporulación de *Bt*. Tras su ingesta por larvas susceptibles, generalmente lepidópteros, la protoxina se solubiliza en las condiciones alcalinas del intestino medio, posteriormente es procesada proteolíticamente por tripsina, la cual está presente en el intestino medio de los insectos, lo que da lugar a la formación del fragmento activo, la toxina Cry1Ac, de menor tamaño (60-65 kDa), la TCry1Ac tiene características citotóxicas (Schnepf, 1998). Las toxinas lisan las células epiteliales del intestino medio del insecto blanco mediante la formación de poros líticos en la membrana apical, desencadenando la muerte del insecto diana. (Liu, et al., 2020)

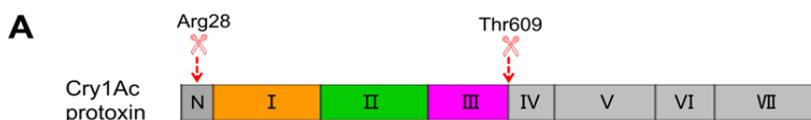


Figura 1 Estructura de Cry1Ac. A) Diagrama esquemático de la protoxinas y toxina. Las flechas rojas representan los puntos de corte Arg28 y Thr609 en donde se lleva a cabo la hidrólisis de las proteasas, las partes eliminadas después de su activación proteolítica se muestran en gris. Los colores naranja, verde y morado representan los dominios I, II y III de la toxina. Tomado de (Liu,2020)

Aunque en la década de 1930 se introdujo inicialmente *Bt* como insecticida en forma de aerosoles, pulverizados, líquidos o polvos que contenían cuerpos paraesporales de *Bt* y se aplicaban en áreas de cultivo donde los insectos se alimentaban, (Rubio-Infante &

Moreno-Fierros, 2016). Las desventajas asociadas a este método, como: la necesidad de aplicaciones frecuentes sobre los cultivos para mantener la efectividad, los riesgos para otros insectos no objetivo y la posible contaminación ambiental fueron algunas de las limitaciones que promovieron el desarrollo y la adopción de organismos genéticamente modificados (OGM) (Bravo, et al., 2011; Liu et al., 2020; Siegel, 2001).

Las industrias agro-biotecnológicas han revolucionado la producción de alimentos a través de la ingeniería genética, específicamente mediante el uso de la tecnología del DNA recombinante, lo que ha permitido el desarrollo de OGM que ofrecen numerosos beneficios, entre ellos, una mayor resistencia a insectos y herbicidas. Uno de los elementos clave en estos avances son los genes insecticidas, como el Cry1Ac. Estos genes son introducidos en los cultivos transgénicos, lo que resulta en la producción de proteínas insecticidas en todos los tejidos de las plantas (Sanahuja, et al., 2011). Esta característica bioinsecticida confiere a los cultivos modificados una protección eficaz contra las plagas, reduciendo así la necesidad de aplicar productos químicos adicionales y en última instancia, mejorando la calidad y la cantidad de la producción agrícola (Figura 2)

A pesar de su amplia comercialización en el mundo, existen pocos estudios en los que se ha evaluado la inmunogenicidad o efectos directos por el consumo de las plantas genéticamente modificadas con *Bt*. Dentro de estos estudios principalmente con un enfoque toxicológico incluyen pruebas de laboratorio como química sanguínea, peso corporal de los animales, de órganos y análisis patológico. Incluyendo la presencia de tumores en algunos estudios (Kennedy, et al., 2018). Es decir, evaluando una respuesta sistémica donde han concluido que el consumo de plantas modificadas por *Bt* son seguras para el consumo humano y animal, basado principalmente en la falta de anomalías en los parámetros mencionados, así como a la falta de toxicidad o muerte asociada al consumo de las proteínas Cry (Adel-Patient et al., 2011). Sin embargo, aún existe gran preocupación y controversia alrededor de la seguridad de las plantas con *Bt* y si estas pueden constituir un riesgo para la salud a largo plazo debido al aumento del uso de estas plantas transgénicas por el mundo, además de la industrialización de los alimentos que va relacionado con el aumento de cuadros alérgicos alimentarios y enfermedades inflamatorias intestinales en las últimas décadas, principalmente en países industrializados (Haslberger, 2006; Hug, 2008).

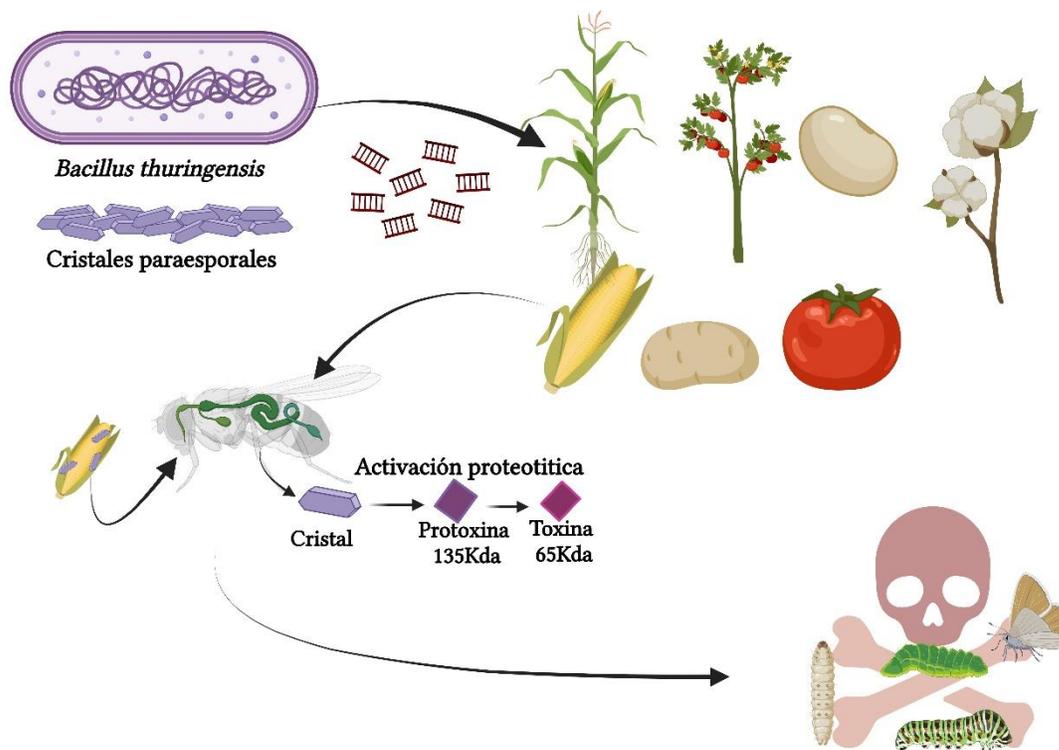


Figura 2 Cry1Ac y su efecto insecticida en lepidópteros. Bacillus Thuringensis produce en su fase de esporulación cristales paraesporales conocidos como Protoxina Cry1Ac. Cuyos genes se han introducido al genoma de diversos cultivos de importancia agrícola, lo que resulta en la producción de TCry1Ac en todo el tejido de la planta. Cuando el insecto blanco ingiere los cristales de Cry1Ac, estos llegan al intestino medio del insecto la protoxina se solubiliza por el pH alcalino del mismo, posteriormente son procesadas proteolíticamente por tripsina que esta presentes en el intestino del insecto, lo que da lugar a la formación del fragmento activo (la toxina) Cry1Ac, de menor tamaño peso molecular (60-65 kDa), responsable de la citotoxicidad, lo que resulta en la formación de poros intestinales que lo llevan al insecto blanco a su muerte.

Estructura de la toxina Cry1Ac

La Toxina Cry1Ac está compuesta por tres dominios que desempeñan roles específicos en su interacción con el receptor y en la formación de poros en el epitelio del intestino medio del insecto. El dominio I, ubicado en el extremo N-terminal de la toxina, está formado por siete hélices α y se cree que desempeña un papel crucial en la formación de poros. Por otro lado, el dominio II está compuesto por tres láminas β antiparalelas con regiones de bucle expuestas, mientras que el dominio III adopta una estructura de sándwich β . Estos dominios, especialmente el II y III, desempeñan un papel importante en

el reconocimiento del receptor, lo que es esencial para la eficacia de la toxina. (Schnepf, 1998) (Grochulski et al., 1995)

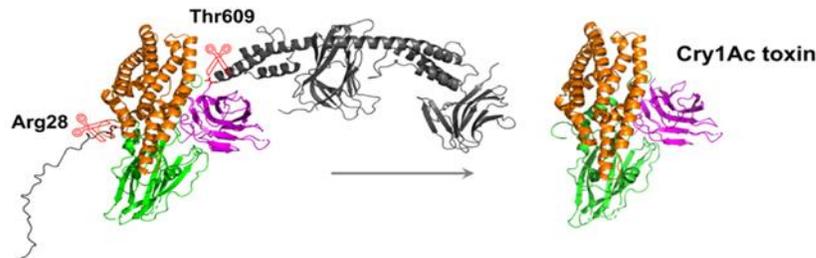


Figura 3. Estructura proteica tridimensional de la protoxina y toxina Cry1Ac. Estructura proteica tridimensional de la protoxina Cry1Ac (135KDa) y la flecha gris representa su activación proteolítica, después de su activación se forma la toxina Cry1Ac (65KDa) se observan tres dominios, cada uno marcado con un color. Tomado de (Liu,2020)

Panorama actual de los Organismos Genéticamente Modificados

La primera planta transgénica fue el tabaco, creada con éxito en 1983 por tres grupos de investigación independientes. En 1990, China se convirtió en el primer país en comercializar tabaco modificado para la resistencia a un virus. En 1994, el tomate Flavr Savr (Calgene, EE. UU.) se convirtió en la primera planta transgénica aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el consumo humano (Bawa & Anilakumar, 2013). Desde entonces, varios cultivos transgénicos recibieron aprobaciones para la producción humana a gran escala entre 1995 y 1999.

A nivel mundial se cultivan 160 millones de hectáreas de alimentos transgénicos, principalmente de arroz, maíz, soja, canola, alfalfa y algodón; producidas por aproximadamente 16.7 millones de agricultores; siendo los principales países exportadores: EU, Canadá, Argentina, Brasil, China y Sudáfrica (James, 2012) (Aldemita, Reaño, et al., 2015)

Desde 1996, en México se han aprobado 170 OGM para alimentos y cultivo: alfalfa (5), canola (13), algodón (31), maíz (75), patata (13), arroz (1), soja (26), remolacha azucarera (1), y tomate (5). (Briefs, 2017). Dentro del producto más consumido en México está el maíz, actualmente existen tres líneas transgénicas de maíz resistentes a lepidópteros (Bt-11, MON-810, Bt-176), comúnmente conocido como maíz Bt, expresan Cry-1Ab (Bt-11, MON-810) y Cry1Ac (Bt-176).

En 2017, se cultivaron a nivel mundial 59,7 millones de hectáreas de maíz Bt y 24,1 millones de hectáreas de algodón Bt. Varios de estos OGM han sido aprobados para el consumo humano (Fleming et al., 2018).

Limitaciones de los Estudios Toxicológicos de las Proteínas Cry1Ac.

Aunque las proteínas Cry1Ac se consideran no tóxicas para vertebrados, es importante tener en cuenta las limitaciones de los estudios realizados hasta ahora, ya que la mayoría de estos estudios se han centrado en su toxicidad, tomando en cuenta parámetros como: ausencia de mortalidad, registros de peso corporal normal y falta de anomalías en patologías macroscópicas realizadas en la necropsia de animales alimentados con estos, (Zeljenková et al., 2014).

Aunque generalmente se considera que las proteínas Cry1Ac no son tóxicas para los vertebrados, es fundamental tener en cuenta las limitaciones de los estudios realizados hasta la fecha. La mayoría de estos estudios se han centrado en la evaluación de su toxicidad, teniendo en cuenta parámetros como la ausencia de mortalidad, registros de peso corporal dentro de los parámetros normales y la falta de anomalías en patologías macroscópicas detectadas durante la necropsia de animales alimentados con cultivos que contienen estas proteínas (Snell et al., 2012).

Es importante destacar que, además de estos hallazgos, se han registrado signos de toxicidad hepatorenal en ratas alimentadas con maíz transgénico en algunos estudios. (Zeljenková et al., 2014) No obstante, estos estudios han concluido que el maíz MON810 es igual de seguro que las variedades convencionales de maíz. Cabe señalar que en la mayoría de los estudios que han evaluado la bioseguridad de las plantas transgénicas Bt, no se han realizado evaluaciones microscópicas para detectar posibles cambios o daños que las toxinas Cry1Ac podrían causar en órganos como el intestino.

En ensayos de bioseguridad, se determinó una dosis letal media (DLm) de 1,290 mg/kg para ratones hembra y 1,460 mg/kg para ratones macho, al alimentarlos con la proteína Cry1Ac durante 14 días. A partir de este ensayo, se ha considerado que las proteínas Cry1Ac son sustancias de toxicidad categoría III, lo que implica que se consideran ligeramente tóxicas solo a concentraciones altas, según la Agencia Americana de Protección al Medio Ambiente (EPA, 2010).

De acuerdo con estos criterios se aprobaron los insecticidas *Bt*, como seguros para vertebrados, una sustancia tóxica categoría III, lo que significa que no tienen que ser probados crónicamente como lo hacen con otros productos químicos, para evaluar si tienen efectos patológicos o inmunológicos a largo plazo, únicamente se consideran tóxicos en concentraciones varias veces superiores a las que se encuentran en las plantas transgénicas (McClintock, 1995) que oscilan en un rango de concentración, desde 0.1 hasta 10 microgramos por gramo de tejido vegetal.

Se ha argumentado que las plantas *Bt* no representan un riesgo de toxicidad debido a que las cantidades consideradas como tóxicas son menores que la observada a la exposición dietética normal. Sin embargo, estas estimaciones también deben revisarse utilizando métodos precisos para cuantificar el contenido de proteínas en las plantas modificadas genéticamente y de las materias primas que las contienen. Asimismo, es importante

considerar que las concentraciones de proteínas Cry expresadas en las distintas plantas transgénicas es variable, tanto en distintas plantas del mismo cultivo, como para las diferentes partes de la planta (hoja, tallo, fruta, raíz) (Dhanaraj, et al., 2019), por lo cual es importante considerar varios factores durante el análisis de su seguridad y efectos potenciales.

El Papel del Sistema Inmune en la Regulación del Intestino Grueso

El intestino es una estructura anatómica particular, ya que desempeña un papel fundamental en el sistema inmune (Figura 4). Las células epiteliales intestinales conforman una monocapa que se mantiene unida mediante uniones estrechas, formando la barrera física que evita el ingreso de organismos patógenos o antígenos. Esta barrera física es recubierta por una capa continua de moco del lado apical de las células epiteliales intestinales, ambas capas recubren a la lámina propia es un tejido conjuntivo que se encuentra por debajo de la capa epitelial intestinal.

La lamina propia contiene una densa población de células del sistema inmune, como linfocitos, células plasmáticas y células dendríticas, que interactúan con los antígenos presentes en el intestino, La lamina propia actúa como un sitio de comunicación entre el sistema inmune y las células epiteliales, permitiendo una respuesta inmunitaria apropiada frente a los antígenos presentes en el lumen intestinal. Además, en la lámina propia se producen factores inmunomoduladores y citocinas que contribuyen a mantener el equilibrio entre la tolerancia y la respuesta inmune en el intestino (Mowat, 2003).

Esta interacción entre las células epiteliales intestinales y la lámina propia es esencial para regular la respuesta inmunitaria local y prevenir reacciones inflamatorias no deseadas. La desregulación inmunitaria intestinal es una de las características claves en la patología de la Colitis ulcerativa (Delaney et al., 2008), esta desempeña un papel importante en el inicio y persistencia de la inflamación crónica y recurrente en el colon (Magalhaes, et al., 2007).

El intestino es una extensa superficie mucosa que interactúa activamente con alimentos, antígenos y bacterias. Por lo que el sistema inmune intestinal debe ser capaz de generar una amplia gama de respuestas inmunitarias, adaptadas para satisfacer el desafío que plantean la exposición a posibles agentes patógenos, para poder asegurar respuestas adecuadas, el sistema inmunitario de la mucosa necesita reconocer antígenos de forma activa y permanente, pero no debe producir respuestas inflamatorias exacerbadas, lo que requiere que el sistema inmunológico sea capaz de discernir entre aquellos que representan una amenaza y los que son inofensivos, en un proceso conocido como tolerancia inmunológica (Janeway, 2019).

La dieta desempeña un papel crucial en este proceso, ya que tiene un impacto directo en el microambiente intestinal, la composición del microbiota, la integridad de la barrera intestinal y las respuestas inmunológicas (Holmes et al., 2017).

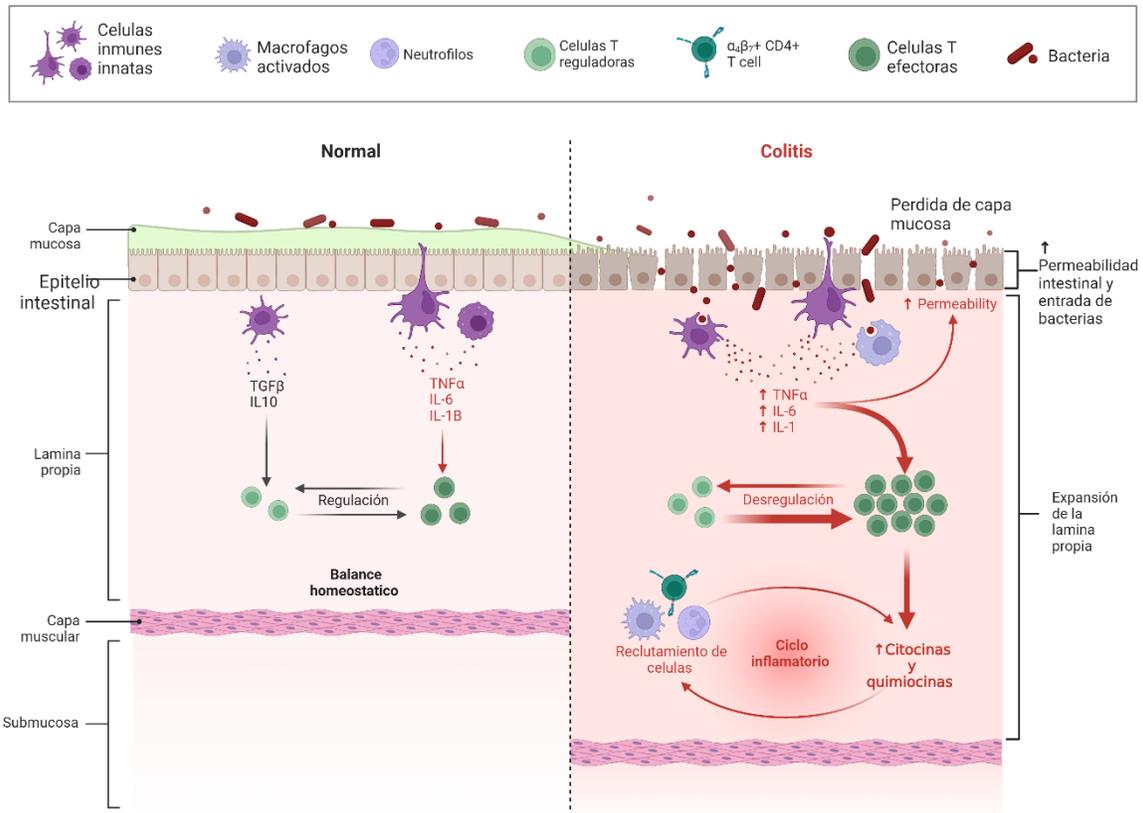


Figura 4 Estructura anatómica del intestino, en condiciones normales y de inflamación. en condiciones normales: las células inmunes se ubican inmediatamente debajo de la barrera epitelial intestinal, en la región de la lámina propia. esta posición, junto con su alta capacidad fagocítica, los prepara para capturar y destruir cualquier comensal o patógeno invasor, así como eliminar células apoptóticas o senescentes. también pueden muestrear directamente el contenido luminal a través de sus prolongaciones entre las células de la barrera epitelial intestinal. los macrófagos *cx3cr1hi* también producen de manera constitutiva interleucina-10 (*il-10*), que facilita la expansión secundaria de las células t reguladoras en la mucosa y puede condicionar a los monocitos recién llegados, la producción de citocinas proinflamatorias es baja, lo que hace que el microambiente se encuentre en condiciones homeostáticas y de tolerancia intestinal. en condiciones inflamatorias: la homeostasis se ve perturbada por la inflamación, hay un reclutamiento de monocitos y sus derivados *cx3cr1int* se acumulan en grandes cantidades y muestran características proinflamatorias. producen citocinas proinflamatorias que pueden exacerban la respuesta inflamatoria de otras células efectoras, como las células t productoras de *ifn-α* e *il-6*. también orquestan el reclutamiento de otras células efectoras innatas, como los neutrófilos, a través de la secreción de quimiocinas inflamatorias, en este estado la tolerancia intestinal se ve afectada. (hecho con biorender)

Incidencia de enfermedades inflamatorias intestinales en la actualidad y su alteración en la respuesta inmune intestinal

Las enfermedades inflamatorias intestinales (IBDs), que incluyen la enfermedad de Crohn (Mosli et al., 2017) y la colitis ulcerativa (Delaney et al., 2008), se caracterizan por la inflamación crónica y recurrente del tracto digestivo. Específicamente, la CU (la cual se abordará en este trabajo de investigación) afecta principalmente el colon y se caracteriza por una inflamación continua de la mucosa intestinal o lamina propia. La CU se manifiesta clínicamente con síntomas como pérdida de peso, diarrea, rectorragia, dolor abdominal y se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer colorrectal (Tome, et al., 2021).

Se ha sugerido que la aparición de las IBDs está asociada a múltiples factores, como la predisposición genética, factores ambientales, la exposición a antígenos lumenales, el uso de cultivos transgénicos y la industrialización alimentaria. (Wirtz, 2017). Aunque las causas precisas de esta enfermedad siguen siendo un tema de controversia, es evidente que su incidencia ha aumentado en las últimas décadas, actualmente se precisa que alrededor del 5-10% de la población a nivel mundial padecen de IBD, las cuales pueden tener efectos sustanciales en todos los aspectos de la vida de quienes la padecen (Internacional fundacion of gastrointestinal disorder, 2023)

Durante el desarrollo de las IBD, se ven afectados varios componentes del sistema inmunitario de la mucosa, provocando una pérdida de homeostasis y de tolerancia intestinal. Se han relacionado varios tipos celulares cruciales en el desarrollo y persistencia de la patogénesis de la colitis ulcerosa (Delaney et al., 2008), entre ellos se incluyen los macrófagos, linfocitos T, linfocitos B las células dendríticas, las células epiteliales y los neutrófilos (Mitsialis et al., 2020). Estas células interactúan entre sí para promover o suprimir la inflamación en la mucosa intestinal.

En condiciones inflamatorias, tanto los macrófagos activados como los neutrófilos y los linfocitos han sido implicados en el incremento de la producción de citocinas proinflamatorias. Estas citocinas desempeñan un papel directo en la patogénesis de las IBD como lo sugieren estudios genéticos e inmunológicos recientes. Además, parecen desempeñar un papel crucial en la regulación de la inflamación intestinal y los síntomas clínicos asociados a estas enfermedades (Neurath, 2014).

Por ejemplo, en la mucosa de pacientes con CU hay una acumulación de macrófagos proinflamatorios, estos se pueden identificar por su alta expresión de CX3CR1+, así como su capacidad para producir grandes cantidades de mediadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6, TNF- α y especies reactivas de oxígeno, que los distingue de los macrófagos encontrados en el intestino sano (Bain & Mowat, 2014).

Antecedentes

Nuestro grupo de investigación ha centrado su atención en investigar las propiedades inmunogénicas de las proteínas Cry1Ac. Se ha demostrado que tanto la protoxina (Vázquez-Padrón, et al., 1999), (Moreno-Fierros, et al., 2000) como la toxina Cry1Ac (Guerrero, et al., 2004) son inmunogénicas tanto a nivel sistémico como en las mucosas (Leticia Moreno-Fierros, et al., 2000), (L. Moreno-Fierros, et al., 2003).

La capacidad inmunogénica de la toxina Cry1Ac se evidenció por primera vez al inducir una respuesta de anticuerpos IgG e IgM cuando se administró por vía intraperitoneal e intragástrica en ratones Balb/c. (Vázquez-Padrón et al., 2000). Mientras que la inmunogenicidad de diferentes familias de toxinas Cry, se evaluó inicialmente en un estudio en el que se encontró que Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac eran capaces de inducir respuestas de anticuerpos IgG e IgA, tanto en suero como en mucosas, después de administrarse vía intraperitoneal o intranasal, demostrando la inmunogenicidad de la TCry1A tanto a nivel sistémico como a nivel de mucosas (D. D. Guerrero & L. Moreno-Fierro, 2004).

En estudios subsecuentes, nuestro grupo se enfocó en caracterizar el efecto adyuvante, particularmente de la protoxina Cry1Ac. Se encontró que la protoxina Cry1Ac tiene un efecto adyuvante sistémico y mucoso, ya que al ser coadministrada con antígenos de diferente naturaleza (péptidos, proteínas o carbohidratos) por vía mucosa o sistémica, era capaz de incrementar la respuesta de anticuerpos mucosos y sistémicos hacia los antígenos coadministrados. Posteriormente se demostró que el efecto adyuvante de la protoxina Cry1Ac podía incrementar la inmunoprotección en distintos modelos e infección (Ibarra-Moreno, et al., 2004) (González-González, et al., 2015). En contraste aunque el efecto adyuvante de la TCry1Ac no se ha caracterizado en detalle, su efecto adyuvante antitumoral es de menor magnitud al de la protoxina (Servin-Garrido, 2022); y el efecto adyuvante en la respuesta inmune hacia OVA es modesto (Santos-Vigil, et al., 2018).

Buscando entender su mecanismo adyuvante se encontró que tanto la protoxina como la toxina son capaces de activar células presentadoras de antígeno como macrófagos, induciendo la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, e incrementar la producción de citocinas con un perfil proinflamatorio (IL-6, INF- γ , TNF- α , MCP- 1) (L. Moreno-Fierros et al., 2013) así mismo de manera relevante se lograron identificar a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs ERK1/2) y p38 entre las vías de señalización que se activan por la estimulación de macrófagos con toxina, vías que están estrechamente relacionada con la inflamación (M. Torres-Martínez, et al., 2016). Además se ha logrado identificar a algunas proteínas de unión a la protoxina en macrófagos, entre las que destacan HSP70 y vimentina, proteínas de superficie (Rubio-Infante, 2018)

Se ha observado que la toxina y protoxina Cry1Ac también tienen la capacidad de activar otros tipos celulares, como linfocitos B, ya que inducen la sobre regulación de CD69 y CD25. También se observó que particularmente la toxina aumenta la proliferación de linfocitos B estimulados *in vitro*, lo que sugiere que puede actuar como un activador policlonal de linfocitos B. Asimismo, tanto la toxina como la protoxina de forma diferencial Cry1Ac provocan la migración y la activación de células dendríticas en el ganglio poplíteo y en bazo, e inducen la sobreexpresión de CD80 y CD86, este efecto fue evaluado *in vivo*

tras una dosis vía intradérmica o intraperitoneal, respectivamente, (Ibarra-Moreno & Ilhuicatzí-Alvarado et al. 2021)

Por otra parte, se ha explorado el potencial alergénico de la toxina Cry1Ac evaluando en un modelo de alergia intestinal si la administración vía intragástrica de la toxina Cry1Ac, pudiera desarrollar signos relacionados con la alergia intestinal. En dicha evaluación, se administró a la proteína Cry1Ac sola o coadministrada con OVA por dos meses, con una dosis semanalmente de 50 µg. Se incluyeron como controles negativos animales administrados con OVA y como controles positivos OVA coadministrado con toxina de cólera. Después de este tiempo se dio un reto de Toxina Cry de 100 µg o de OVA y se evaluaron varios parámetros relacionados con la alergia alimentaria, en los cuales de los hallazgos más relevantes fueron signos de alergia moderada similares al control positivo, inducción de anafilaxia moderada ante el reto sistémico de Cry1Ac, la inducción de IgE en suero, incremento en el reclutamiento de granulocitos al intestino y desarrollo de hiperplasia de tejido linfoide en el colon del ratón, esta hiperplasia no se mostró reversible después de un mes cuando se dejó de administrar la toxina Cry1Ac por vía intragástrica. (Santos-Vigil, et al., 2018)

Los resultados de otro estudio también sugieren que la alimentación de ratones con maíz MON810 puede provocar alteraciones en las poblaciones de células inmunitarias intestinales y periféricas (Finamore et al., 2008), en otro estudio en donde se evaluó los efectos de alimentar ratas con 11% o 33% de maíz transgénico que (MON810) durante 5 y 14 semanas se encontró un mayor número de eosinófilos en sangre, sin embargo en este estudio no realizó ningún examen relacionados en los intestinos. Además, encontraron que las ratas alimentadas con maíz transgénico presentaron algunos signos de toxicidad hepatorenal; sin embargo, concluyeron que MON810 era tan seguro como las variedades convencionales de maíz (Zeljenková et al., 2014). Lo que sugiere que la caracterización de los efectos celulares a nivel intestinal debería ser evaluados.

También se han evaluaron, los efectos de la toxina y protoxina Cry1Ac en células epiteliales Caco2-C2bbE1, en donde se encontró que la toxina activa vías de señalización como ERK1/2, p38 y JNK, disminuyeron la resistencia eléctrica trans epitelial, aumentan la permeabilidad de la barrera por la disminución de la proteína de anclaje ZO-1 (zona ocludens-1) e indujeron la producción de IL-8, dicho estudio sugiere que la TCry1Ac tiene efectos a nivel del epitelio intestinal. (Bautista-Jacobo, 2023)

Justificación

Dado que se ha comprobado que la TCry1Ac posee propiedades inmunogénicas, estimula la activación de células que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, activa vías de señalización asociadas con inflamación causan efectos alérgicos leves y afecta la integridad de la barrera intestinal, es importante seguir caracterizando su potencial impacto a nivel intestinal.

Hipótesis

La administración intragástrica de la TCry1Ac inducirá una respuesta inflamatoria en intestino grueso.

Objetivo general

Evaluar si la administración intragástrica de TCry1Ac en un modelo agudo puede inducir una respuesta inflamatoria en el intestino grueso.

Objetivos particulares

- Determinar si la administración vía intragástrica de la TCry1Ac induce parámetros físicos asociados a enfermedades inflamatorias intestinales.
- Examinar si la administración intragástrica de la TCry1Ac en ratones sanos modifica el perfil de citocinas en el intestino grueso y suero mediante la cuantificación por método de ELISA.
- Evaluar histológicamente cortes de intestino grueso tras la administración intragástrica de TCry1Ac utilizando la tinción H&E.
- Determinar si la administración oral de TCry1Ac provoca cambios en las poblaciones de células residentes de la lámina propia, relacionadas con las enfermedades inflamatorias intestinales (IBDs) en el intestino grueso mediante citometría de flujo.

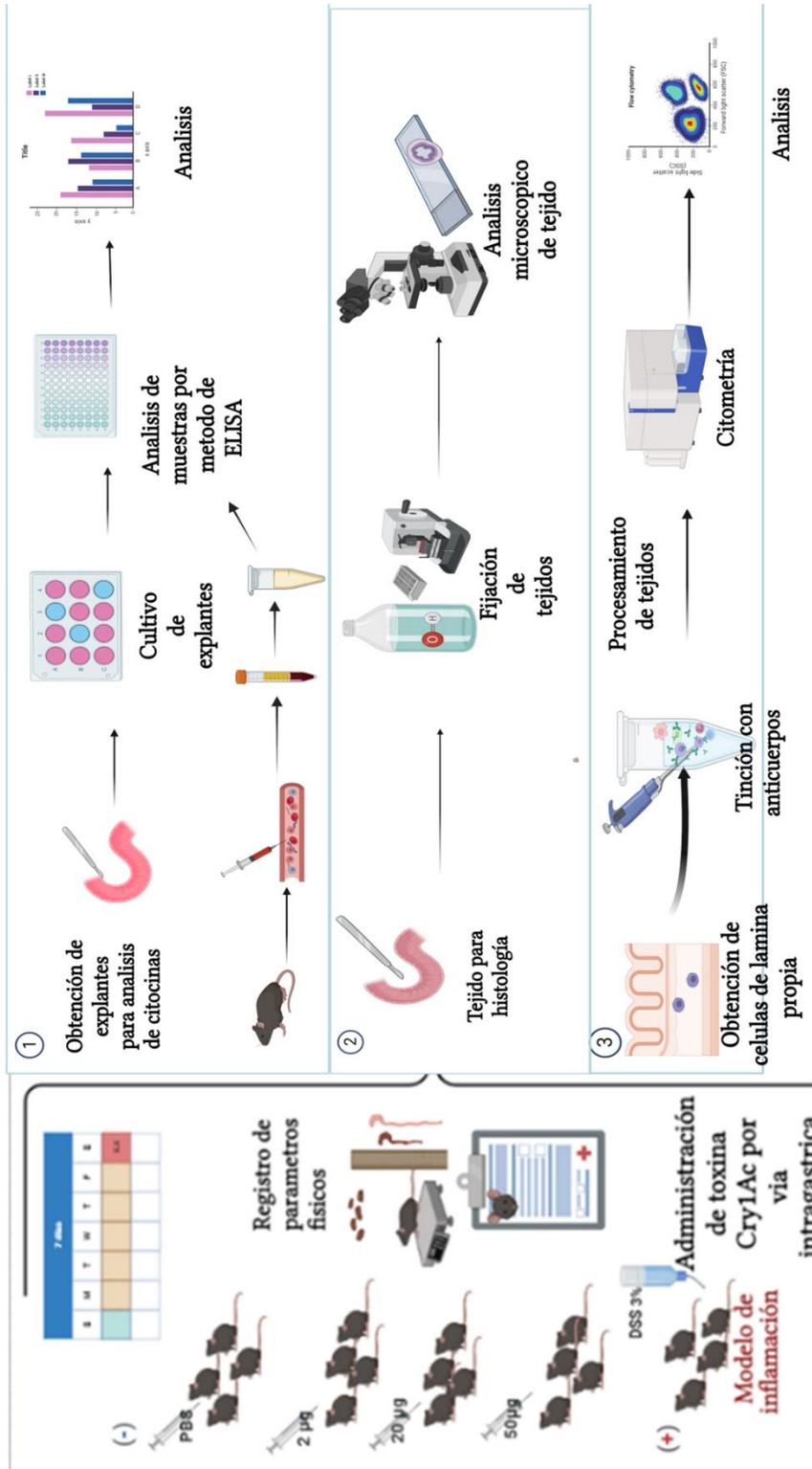


Figura 5. **Estrategia experimental. Administración de la TCry1Ac:** Muestra la administración por vía intragástrica de las tres diferentes dosis de TCry1Ac, así como los controles positivo y negativo, junto con el registro de los parámetros físicos. Recuadro 1: Representa la obtención del explante, su posterior cultivo, la cuantificación y el análisis de las citocinas. Recuadro 2: Muestra el proceso de obtención del tejido para su procesamiento mediante la técnica histológica H&E, seguido del análisis histológico. Recuadro 3: Describe la obtención de células del intestino grueso, obtenidas de la lámina propia, su tinción y el análisis de las muestras mediante citometría de flujo. Esta figura es una representación visual de la metodología utilizada para llevar a cabo la investigación y cumplir con los objetivos específicos del estudio.

Metodología

Selección de las dosis evaluadas

Esta investigación se llevó a cabo con 3 dosis, las dosis fueron: 2µg 20µg y 50µg de toxina/25 g de ratón administrada vía intragástrica en un modelo agudo, por 7 días extrapolando estas dosis a las que podría consumir un humano adulto de 60kg se obtuvieron los siguiente resultados tabla 1, estos niveles se podrían consumir fácilmente mediante el consumo de algunas plantas modificadas genéticamente en las que de proteínas Cry, se han estimado muy bajos como lo es el maíz MON 810, cuya expresión de la Toxina Cry1 se estima en 0.013µg/g del peso total del fruto (Dong, et al., 2019). Sin embargo, es importante mencionar que los niveles de expresión de proteínas Cry en las plantas pueden diferir considerablemente de acuerdo con cada cultivo, por ejemplo, el nivel de expresión de la papa = 45µg/g, berenjena = 16.17µg/g.

Dosis evaluada en ratones (25g)	Dosis equivalente en humanos (HED) estimada por BSA para una persona de 60kg	Estimación de la cantidad de maíz MON810 que un adulto humano debería consumir para igualar la dosis probada en ratones.
2µg	0.400mg	30.76 g
20µg	4.000mg	307.69
50µg	10mg	769.23

Para realizar una conversión precisa de las dosis utilizadas en estudios en animales a estudios en humanos, aplicamos el método de normalización del área de superficie corporal (BSA, por sus siglas en inglés). Este método se basa en la correlación de varios parámetros biológicos en diversas especies de mamíferos, que incluyen la tasa respiratoria, el gasto calórico, el metabolismo basal, el volumen sanguíneo, las proteínas plasmáticas circulantes y la función renal (Reagan-Shaw, Nihal, & Ahmad, 2008)

La fórmula utiliza un factor, conocido como Km, que resulta de dividir el peso corporal (en kilogramos) por el BSA (en metros cuadrados). Este factor se emplea para convertir la dosis inicial, expresada en miligramos por kilogramo (mg/kg), en una dosis equivalente en miligramos por metro cuadrado (mg/m²). Los valores de Km se han estandarizado para especies específicas, considerando un peso promedio de la especie en cuestión, como humanos, babuinos, perros, monos, conejos, cobayas, ratas, hámsteres y ratones, los valores utilizados se basados en datos de directrices de la FDA (Food and Drug Administration, 2002)

Este método se considera más apropiado que la simple extrapolación de la dosis basada únicamente en el peso corporal, ya que esta última aproximación puede dar lugar a comparaciones inadecuadas entre diferentes estudios (Pai, et al., 2012)

Formula de dosis evaluada en animales a dosis equivalente humana estimada por BSA.

$$\text{HED} = \text{Dosis animal evaluada (mg/kg)} \cdot \frac{(\text{Km animal})}{(\text{Km humano})}$$

Extracción y purificación de las proteínas toxina Cry1Ac

La protoxina Cry1Ac recombinante se purificó a partir de cultivos de *E. coli* JM103 (Pos900).

Para la realización de los ensayos, primero se purificaron las proteínas Cry1Ac. Se obtuvo a partir de una bacteria recombinante de *Escherichia Coli* (*E. Coli*), la cual se cultivó en medio Luria-Broth con ampicilina 100µg/ml, con antibiótico; fueron incubados por 36 horas, en agitación constante de 250-300 rpm y a una temperatura de 37°C. Las bacterias se cosecharon centrifugando a 10,000 rpm durante 15 minutos 4°C.

Para la lisis bacteriana se utilizó sacarosa, lizozima y Tris-EDTA, posteriormente se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm y la pastilla fue lavada en un sonicador con una solución de NaCl, para obtener los cristales de la protoxina, que se solubiliza en amortiguador de carbonatos 0.1M a un pH de 9.6 y más de 10Mm de DTT por dos horas a 37°C. Una vez obtenida la protoxina de 130 kDa, se activó la toxina a través del procesamiento proteolítico con tripsina (D. D. Guerrero, L. Moreno-Fierro, 2004) obteniendo de esta manera la toxina Cry1Ac de 65 kDa.

La pureza de la toxina Cry1Ac se analizó mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE. Después de comprobar la banda en 65kDa se realizó una cromatografía en columna de polimixina para eliminar los posibles residuos de LPS. La concentración de la proteína se determinó por el método de Bradford. Finalmente se pasó por un filtro de 0.22mm para garantizar su esterilidad.

Administración intragástrica de Toxina Cry1Ac

La toxina Cry1Ac se administró a ratones hembra C57BL/6 de 6-8 semanas de edad por vía intragástrica, utilizando una jeringa estéril y una cánula. Se emplearon 3 diferentes dosis de Toxina (2µg, 20µg y 50µg) en un volumen total de 100µL, cada dosis se diluyó para llegar al volumen correspondiente con amortiguador de fosfatos (PBS). Mientras que al control negativo se le administro por la misma vía 100µL de PBS. Los ratones fueron proporcionados por el bioterio de la FES Iztacala, UNAM con alimento y agua estéril. El esquema de administración fue 1 dosis diaria por individuo durante 7 días.

Esquema de inducción de inflamación intestinal con DSS (control positivo).

Para inducir la inflamación intestinal en los ratones, se utilizó un modelo de colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) al 3%. El grupo experimental recibió agua estéril con DSS al 3% durante 7 días consecutivos, siendo esta su única fuente de hidratación. Se monitoreó diariamente, la pérdida de peso y signos de enfermedad, para asegurar la aparición de colitis en los ratones del grupo experimental. Después de 7 días de tratamiento con DSS, los ratones fueron sacrificados para la obtención de muestras de tejido para su posterior análisis.

Evaluación de los parámetros físicos asociados a enfermedades inflamatorias intestinales.

Se registraron los siguientes parámetros físicos en los ratones de todos los grupos:

- Pérdida de peso: Se registró el peso corporal de los ratones al inicio del experimento y se registró diariamente durante el periodo de inducción de la inflamación con DSS y la administración de la toxina Cry1A.

- Sangre oculta en heces: Se recolectaron muestras de heces de los ratones al concluir el período de inducción de la inflamación con DSS y la administración de la toxina Cry1Ac. Para detectar la presencia de sangre oculta, se empleó un kit comercial de detección de sangre en heces denominado "Hema-Screen" de Immunostics, Inc.
- Disminución del peso del colon: Al final del experimento, se sacrificaron los ratones y se diseccionó el colon. Se registró la longitud del colon, como indicador.

Obtención de explantes de colon y ciego para cuantificación de citocinas.

Se obtuvieron dos explantes por individuo: uno del ciego y otro del colon, esto al finalizar la administración vía intragástrica de los diferentes tratamientos, que incluyeron PBS, DSS 3%, TCry1Ac 2µg, TCry1Ac 20µg y TCry1Ac 50µg. Cada explante fue pesado cuidadosamente para su estandarización como se describe a continuación.

Se disceptó el intestino grueso, desde el ciego gástrico hasta la porción del recto, se lavó el intestino con PBS y se disceptó un segmento de 1 cm de tejido proveniente de una parte del colon ascendente conocida como ciego gástrico, mientras que otra porción se obtuvo de la sección media del colon, estos explantes fueron lavados con medio RPMI, para ser colocados en tubos eppendorf y ser pesados, al finalizar este paso los segmentos de tejido fueron colocados por separado en placas de cultivo con 1mL de medio RPMI con antibiótico bajo condiciones de esterilidad durante 24 horas a 37°C, para la obtención de las citocinas a partir del sobrenadante.

Recuperación del sobrenadante:

Posterior a las 24 horas de cultivo, se recuperó el sobrenadante de las placas y se centrifugo a 3,500 rpm durante 5 minutos a 4°C y se almacenó a -70°C hasta su uso en la cuantificación de citocinas por método de ELISA.

Cuantificación de citocinas por método de ELISA.

Las citocinas de TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-10 fueron evaluado a partir del sobrenadante obtenido de los explantes, su cuantificación se llevó a cabo por ensayo (ELISA) utilizando los kits Murine Standard ABTS ELISA Development (PeproTech) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para este análisis, en una placa para ELISA se colocó el anticuerpo de captura de cada citocina en 100µl por cada pozo, incubándolo una noche a 4°C. Posteriormente se lavó cada pozo utilizando PBS + Tween-20 al 0.05%, al finalizar se bloqueó con 100 µl de PBS-BSA al 1%, y se incubó durante 2 horas, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS + Tween-20 al 0.05%. A continuación, se realizó una curva diluyendo el estándar de cada citocina y se dejó incubar por 2 horas, posteriormente se lavó 4 veces con buffer PBS + Tween-20 al 0.05%, a continuación, se agregó el anticuerpo de detección en una concentración de 100µl por pozo, se dejó incubar por dos horas a 4°C, y se lavó por triplicado con buffer de lavado. Se añadieron 100µl por pozo de Avidina-HRP conjugada, en una dilución 1:2000, se incubó por 30min a 4°C, se lavó por triplicado con buffer PBS + Tween-20 al 0.05%. Finalmente se agregó ABTS + H₂O₂ diluido 1:10, en un volumen de 100µl por pozo. Se leyó cada 5min hasta llegar a 45min con ayuda del espectrofotómetro modelo: ELx800. Posteriormente los resultados de las concentraciones de las citocinas a partir de la interpolación de los datos fueron normalizados con la siguiente formula.

$$1.- \text{ peso del explante (mg)} = a \frac{\text{volumen del medio (Koul, Yadav, Sanyal, \& Amla)}}{\text{volumen del medio (Koul, Yadav, Sanyal, \& Amla)}}$$

2.- $\frac{[\] \text{ muestra obtenida pg/ml por ELISA}}{\text{a mg/ml}} = \frac{\text{ng/g de tejido}}{\text{a mg/ml}}$

Análisis histológicos

Se obtuvieron cortes de segmentos de colon y ciego de aproximadamente 0.5 cm, los cuales se fijaron con paraformaldehído al 4%. Posteriormente se deshidrataron en alcohol etílico a concentraciones crecientes desde el 30% y hasta alcanzar el alcohol absoluto. Los cortes se embebieron en bloques de parafina y se cortaron en secciones transversales de 3-6 μm de grosor para ser teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) y su posterior análisis histopatológico.

El análisis patológico de las secciones de tejido fue realizado por servicios especializados de patólogos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. La escala inflamatoria por análisis histopatológico se evaluó por observación empleando un sistema de puntuación que se muestra en la figura 11.

Obtención de células de la lámina propia para análisis por citometría de flujo.

Después de completar la administración intragástrica de Toxinas Cry1Ac durante 7 días, se extrajo el intestino grueso de 4 ratones C57BL/6 por grupo experimental (PBS, DSS, TCry2 μg , TCry20 μg y TCry50 μg) desde el colon ascendente hasta la porción del recto. Posteriormente, el intestino fue lavado, evertido y mantenido en medio RPMI con 1.5 mM de EDTA y 1 mM de DTT durante 30 minutos a 37°C con agitación de 150 rpm para obtener la capa de células epiteliales. Este paso fue esencial para acceder a la lámina propia. Una vez que se obtuvieron las células epiteliales, se recuperó el intestino y se incubó en medio RPMI con 60 $\mu\text{g/ml}$ de colagenasa tipo IV en agitación constante durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se transfirió a una caja Petri que contenía 200 μl de SBN, esto nos permitió liberar y disgregar las células, para ello se oprimió ligeramente el intestino con ayuda de un émbolo de jeringa para permitir la liberación de las células de la lámina propia, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y finalmente las células se resuspendieron en medio RPMI.

Se tomaron 1×10^6 células de la lámina propia y se incubaron con los siguientes anticuerpos monoclonales: CX3CR1-FITC, Ly6G-PE-Cy7, CD11b-FITC, CD19-Pacific Blue, CD3-FITC, CCR2-APC, CD80-R-PE y CD86.

Citometría de flujo

Las células obtenidas anteriormente, se incubaron en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente con 20 μL de los siguientes anticuerpos monoclonales diluidos: CX3CR1, CD11b, CCR2, Ly6G, CD19 y CD3. Después de este tiempo, las células se lavaron con PBS-BSA al 0.5% y se suspendieron en 0,4 mL de PBS-paraformaldehído al 1%. Las intensidades de fluorescencia se analizaron usando un citómetro de flujo Attune del área de citometría de flujo del Laboratorio nacional de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Se determinó la intensidad de fluorescencia media de las células marcadas con anticuerpos monoclonales específicos, comparando con el anticuerpo control de isotipo apropiado. Los datos obtenidos de la citometría de flujo se analizaron con el software Flow Jo 7.6.

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico, utilizamos el software Graph Pad Prisma 8.0. Se evaluaron los grupos, mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Se consideraron estadísticamente significativos los valores con un nivel de significancia (p) menor a 0,05.

Resultados

Extracción y purificación de la toxina Cry1Ac

Se obtuvo toxina Cry1Ac de 65 kDa, a partir de *E. coli*. La toxina Cry1Ac fue previamente purificada, cuantificada y sometida a una columna de polimixina para eliminar posibles restos de LPS. Posteriormente, se filtró a través de un filtro de 0.22 micras para asegurar su esterilidad. Después de su purificación se corrió un gel SDS-PAGE al 10% corroborando su peso molecular (65KDa) y pureza (Figura 6).

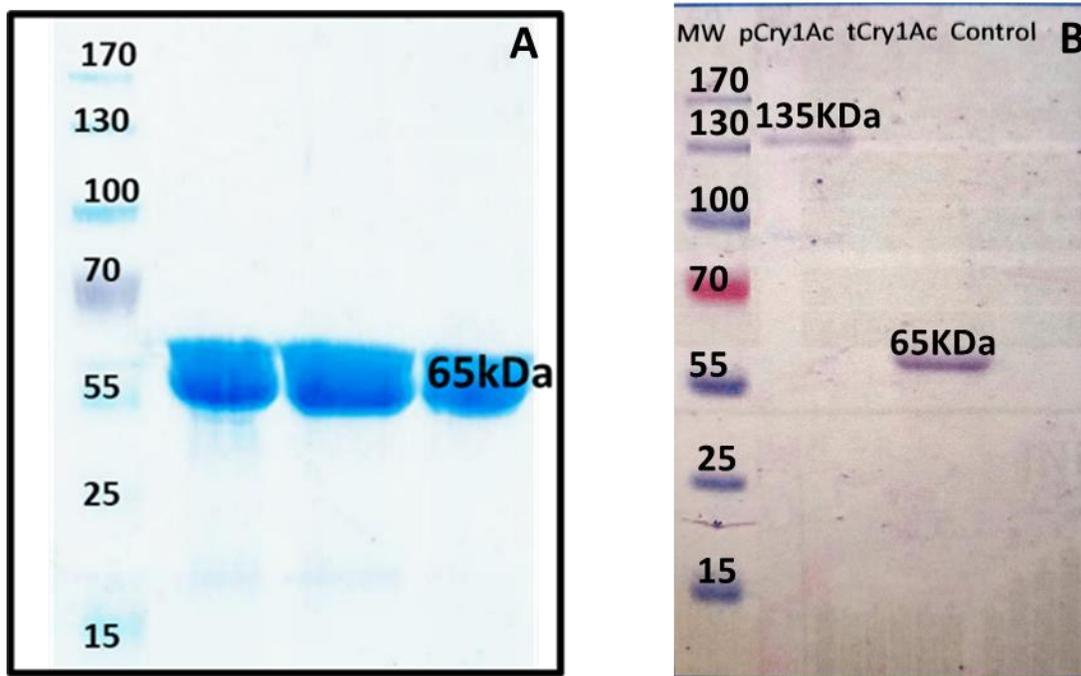


Figura 6 Proteínas Cry1Ac. A) En la figura se observan las bandas con un peso esperado de la TCry1Ac (65KDa). B) Proteínas Cry1Ac disociadas de perlas de sefarosa, en la figura se muestran las bandas de las obtenidas al disociar las proteínas conjugadas a las perlas de sefarosa, en el carril 2 se muestra la protoxina Cry1Ac con un peso molecular de 135KDa, que es una proteína previa a obtener la protoxina y en el carril 3 se observa la Toxina Cry1Ac con un peso molecular de 65KDa, por último en el cuarto carril se muestra el control negativo.

Parámetros físicos de la inflamación

Para determinar si la administración intragástrica de la TCry1Ac induce cambio en los parámetros físicos asociados a inflamación intestinal, después de su administración intragástrica a diferentes dosis 2 μ g, 20 μ g y 50 μ g, durante 7 días, junto con el control negativo (PBS) y el control positivo (DSS3%). Se cuantificó el peso en gramos de cada individuo, en cada grupo de tratamiento a lo largo de los 7 días que duró la administración intragástrica (Figura 7A), cabe aclarar que el peso promedio inicial era de 25g, sin embargo, se decidió se graficó y analizó si existía una disminución del peso promedio inicial del grupo tratado respecto al PBS conforme pasaron los días. Se observó que no hubo diferencias significativas de grupos tratados con TCry1Ac respecto al grupo PBS, mientras que el grupo tratado con DSS 3% tuvo una disminución de peso estadísticamente significativa a partir del cuarto día de administración del DSS, tal y como se esperaba en este grupo. Ya que también se considera un parámetro de inflamación intestinal la disminución del tamaño de

intestino se midió la longitud del intestino grueso de cada individuo en tratamiento (Figura 7 B y C), con ayuda de un vernier los resultados mostraron que; aún que hay una tendencia de acortamiento correlacionada con una mayor concentración de la dosis de TCry1Ac no hubo diferencia significativa respecto al PBS. Por último, se evaluó la sangre oculta en heces, con ayuda de un método cualitativo en dónde el único resultado positivo fue en el grupo de DSS 3% mediante el cambio de coloración del reactivo a azul indicaba sangre oculta en heces (Figura 7C).

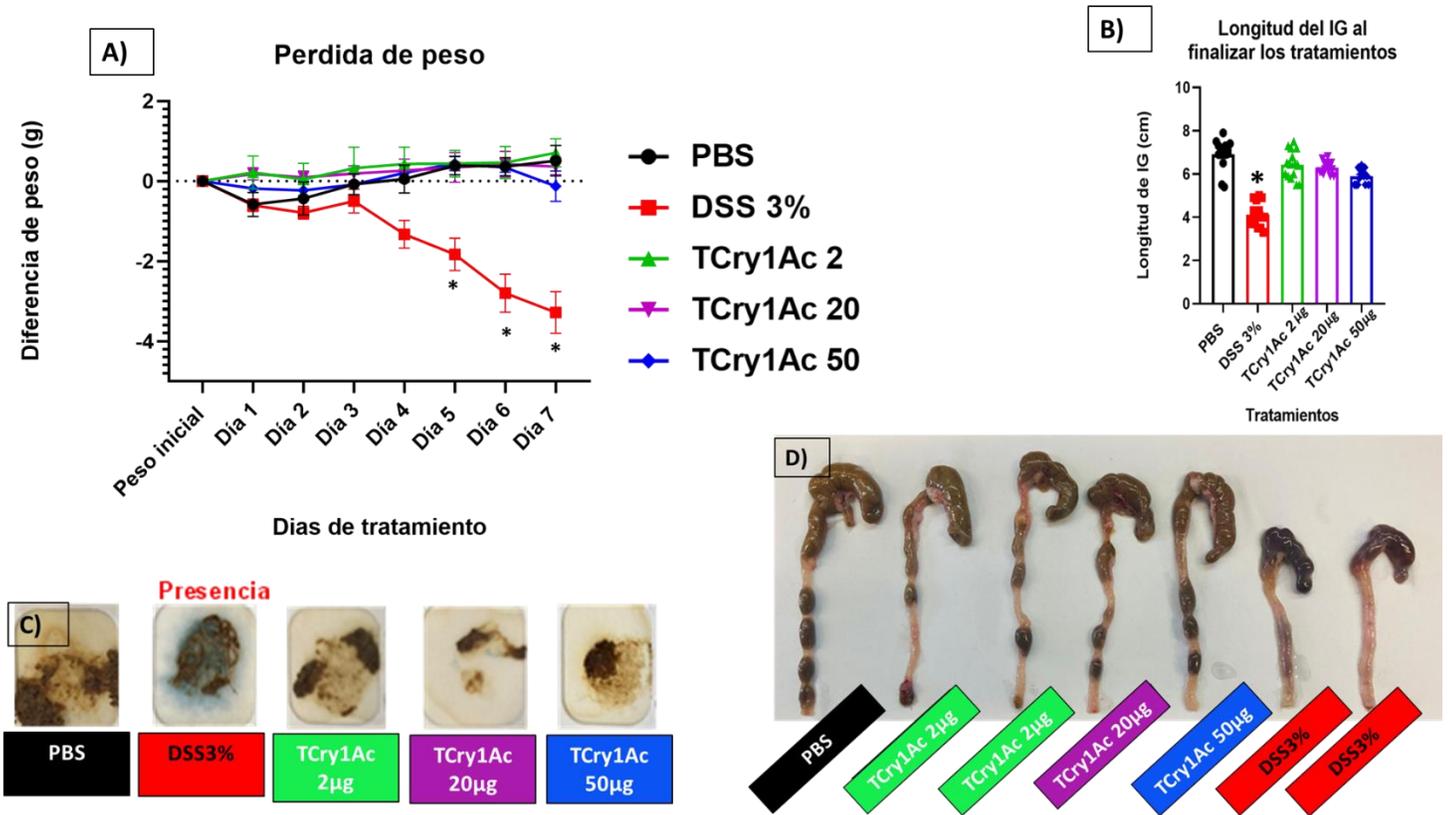


Figura 7 Parámetros físicos de inflamación. A) Pérdida de peso, grafica lineal en donde se muestra el peso promedio de los individuos de cada tratamiento con una n=8. Diferencia significativa vs peso inicial *(P<0.05). B) Longitud del intestino grueso de cada tratamiento, grafica de barras con una n=8, en donde se observa una ligera tendencia en la disminución del tamaño del intestino correspondiente al aumento de la concentración de las dosis de nuestros tratamientos con toxina Cry1Ac, aún que esta disminución no fue estadísticamente significativa. C) Prueba de sangre oculta en heces, en donde la única muestra positiva fue el grupo de DSS 3% (control positivo). D) Imagen representativa en donde se muestra el tamaño del intestino grueso de los diferentes grupos a los que se les administro la toxina Cry1Ac, junto con los controles en donde la disminución del tamaño del Intestino grueso está relacionada con la inflamación de este.

Cuantificación de citocinas en sobrenadante de explantes de colon.

Para evaluar el perfil de citocinas en el intestino grueso, se cuantificaron cuatro citocinas relevantes en procesos inflamatorios intestinales, mediante el método de ELISA al finalizar los 7 días de administración intragástrica de la TCry1Ac. En colon los resultados mostraron que IL-6 tuvo un aumento significativo en el grupo DSS3%, en comparación con el grupo PBS, como era de esperarse mientras que en los grupos de TCry1Ac no se observó un aumento (Figura 8). Por otro lado, hubo una disminución significativa en la expresión de IL-10 en los tres grupos a los que se les administro vía intragástrica la TCry1Ac, incluyendo el grupo DSS3% (Figura 8). Por último, TNF-α mostró un aumento significativo en el tratamiento con TCry1Ac a

2µg en comparación con el grupo PBS, mientras que IL-1β no presentó diferencias significativas en los diferentes tratamientos (Figura 8C).

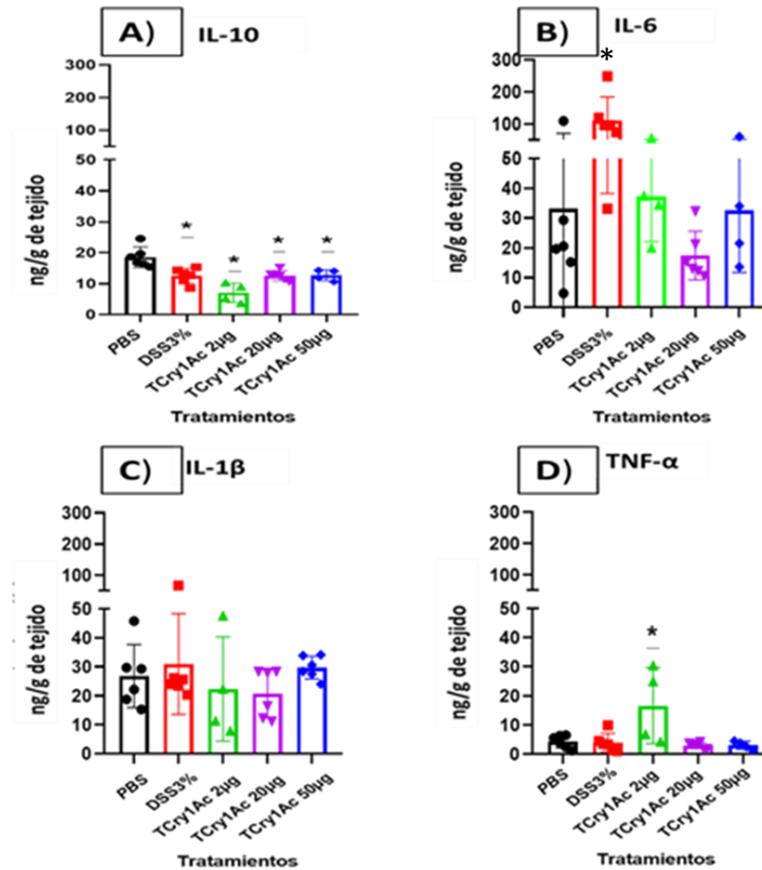


Figura 8. Expresión de IL-10, IL-6, IL-1β y TNF-α en sobrenadantes del cultivo de explantes de Colon. Graficas de barras en donde se muestra concentración de citocinas por análisis de ELISA. A) IL-10 se observa una diferencia estadística con respecto al PBS tanto en el control positivo (DSS3%) como en los grupos a los que se les administro las diferentes dosis de TCry1Ac. B) IL-6, C) IL-1β. D) TNF-α, se observa una diferencia estadísticamente significativo de TNF-α en el grupo de TCry1Ac 2µg comparándolo con el grupo PBS.

Se reporta por ng de citocina por gramo de tejido, se realizó una normalización de las concentraciones para ser reportadas en ng de citocina por gramo de tejido en cultivo. * $p < 0.05$.

Cuantificación de citocinas en sobrenadante de ciego.

En ciego se encontró que, aunque hay una tendencia de aumento en IL-6 en los grupos DSS3% y el grupo TCry1Ac50µg, esta diferencia no es significativa en comparación con el grupo de control negativo (Fig 9 B.2). Además, hubo una disminución en la producción de IL-10 en los grupos DSS3%, TCry1Ac2µg y TCry1Ac20µg, dicha disminución fue estadísticamente significativa, por otro lado, la interleucina-1β no presentó diferencias significativas en los grupos tratados con diferentes dosis de TCry1Ac, excepto en el grupo DSS3%, que tuvo una disminución significativa. Por último, TNF-α, tuvo un aumento estadísticamente significativo en su producción en el grupo TCry1Ac2µg con respecto al colon (Figura 9)

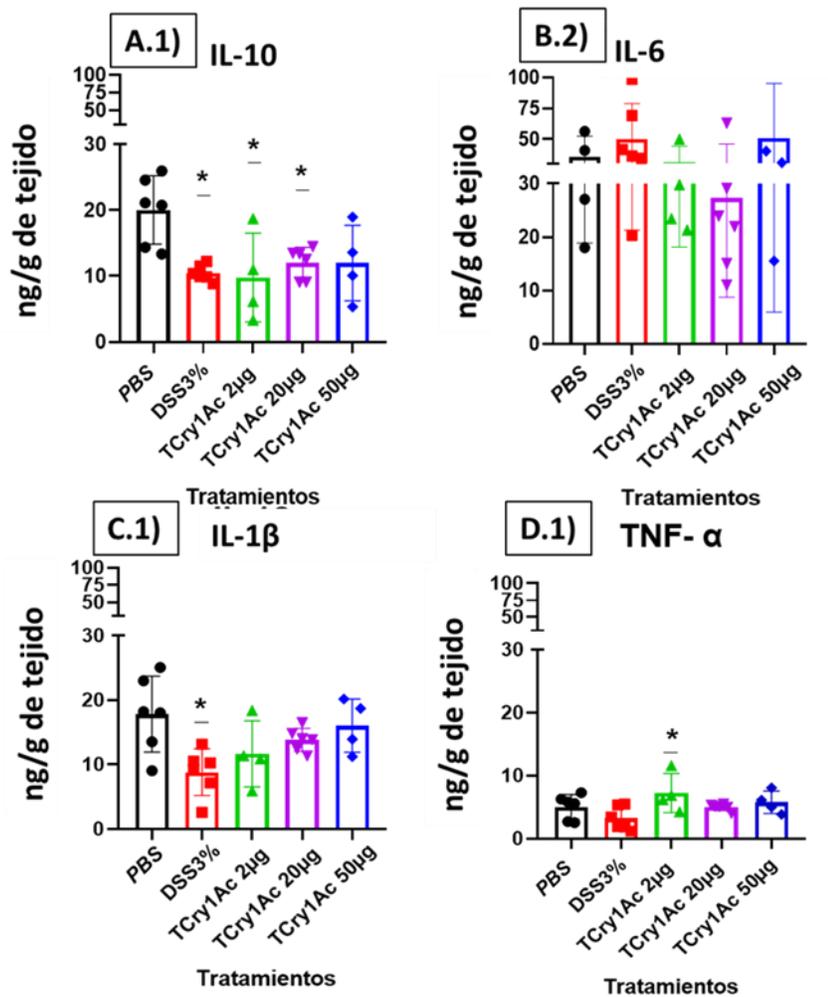


Figura 9 Expresión de IL-10, IL-6, IL-1β y TNF-α en sobrenadantes del cultivo de explantes de Ciego. Graficas de barras en donde se muestra concentración de citocinas por análisis de ELISA. A) IL-10 se observa una diferencia estadística con respecto al PBS tanto en el control positivo (DSS3), así como en dos grupos a los que se les administro la TCry1Ac (2μg y 20μg). B) IL-6, C) IL-1β y D) TNF-α, se observa una diferencia estadísticamente significativa de TNF-α en el grupo de TCry1Ac 2μg comparándolo con el grupo PBS.

Se reporta por ng de citocina por gramo de tejido, se realizó una normalización de las concentraciones para ser reportadas en ng de citocina por gramo de tejido en cultivo. *p<0.05.

Expresión de citocinas en suero sanguíneo

Se cuantificó el perfil de citocinas sistémicas en los individuos después de la administración intragástrica durante 7 días, utilizando muestras de suero sanguíneo y el método ELISA. Los resultados indican un aumento estadísticamente significativo de IL-6 en el grupo TCry1Ac 2μg, que es similar al observado en el control positivo DSS3% (Figura 10A). En IL-10, se observó una disminución significativa en el grupo TCry1Ac50 μg con respecto al grupo PBS, mientras que hubo un aumento en los grupos TCry1Ac2 μg y TCry1Ac20 μg (Figura 10B). En IL-1β, solo el grupo TCry1Ac50 μg mostró una disminución significativa con

respecto al PBS (Figura 10C). Por último, no se encontraron diferencias significativas en la detección de TNF- α en el análisis de suero sanguíneo (Figura 10D).

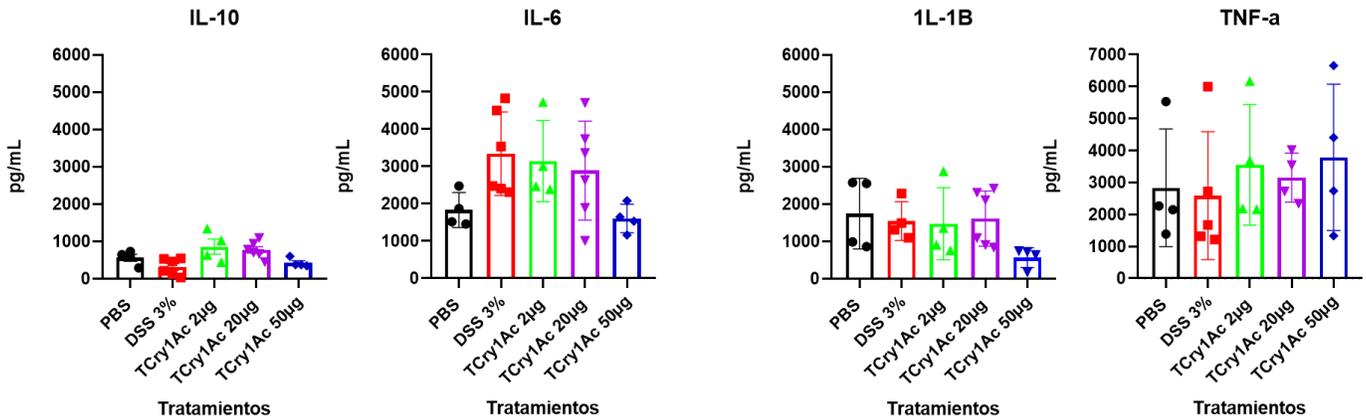


Figura 10. Expresión de citocinas en suero. Graficas de barras en donde se muestra concentración de citocinas por análisis de ELISA. A) IL-6 B) IL-10 C) IL-1 β y D) TNF- α . Se reporta por pg de citocina por mililitro de suero sanguíneo. Diferencia significativa vs PBS * $p < 0.05$ n=4-6.

Análisis histopatológico en colon, tras la administración intragástrica de toxina Cry1Ac

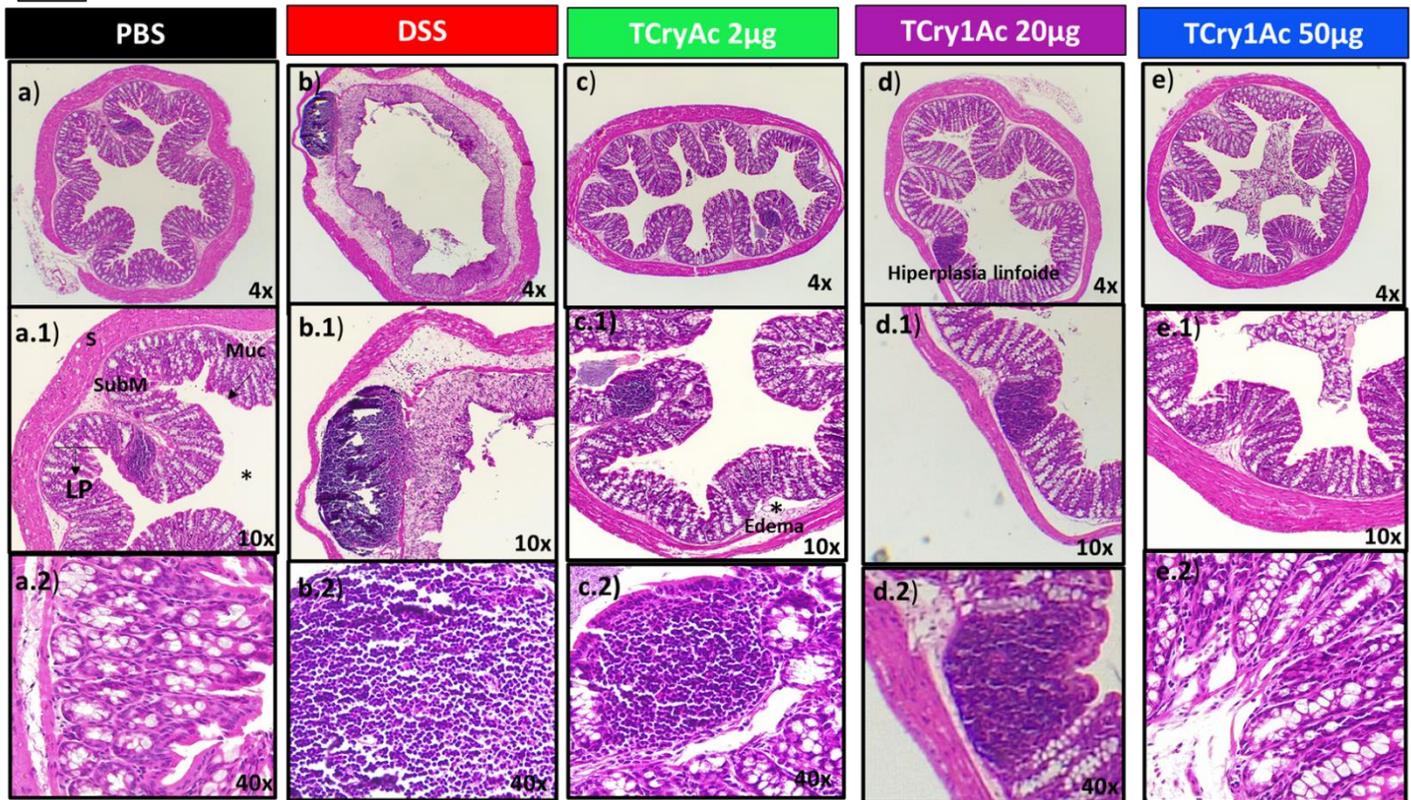
Los resultados de nuestro estudio histológico del colon y ciego se presentan a continuación. (Figura 11). Para evaluar los efectos de diferentes dosis de TCry1Ac en el tejido del colon, realizamos imágenes de histología con tinción H&E y un análisis histopatológico detallado. Se utilizó un sistema de puntuación semicuantitativo para calificar la gravedad y el alcance de la inflamación en las secciones H&E: la puntuación de gravedad se calificó de la siguiente manera: 0 = nulo, 1 = leve 2 =moderada, 3 =Grave (Figura 11C).

En la histología del colon, observamos la presencia de hiperplasia linfoide, calificada como leve a moderada (Figura 11d). También se registró edema en esta zona, catalogado como leve (ver Figura 11c.1). El edema se define como una acumulación anormal de líquido en el tejido del colon, y su aparición puede estar relacionada con procesos inflamatorios o irritación de la mucosa intestinal.

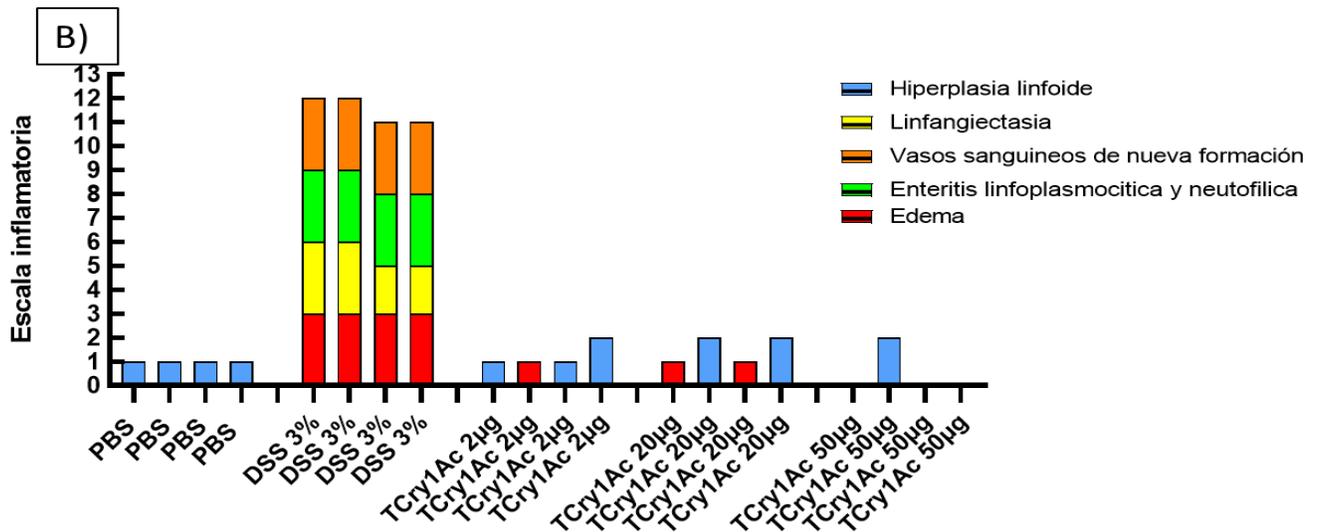
Por otro lado, en el ciego (Figura 12), identificamos la presencia de edema leve en todos los grupos analizados, siendo más grave en el grupo tratado con DSS. La presencia de edema en el grupo control tratado con PBS (control negativo) nos sugiere que esto podría deberse a las particularidades fisiológicas del ciego. La fisiología del ciego puede predisponer a la acumulación de líquido en este tejido, lo que explicaría la presencia de edema incluso en el grupo tratado con PBS.

Estos resultados indican que la administración de TCry1Ac en las tres dosis evaluadas no generó un aumento en la escala inflamatoria medida por análisis histopatológico.

A) Histología de colon con H&E



Colon

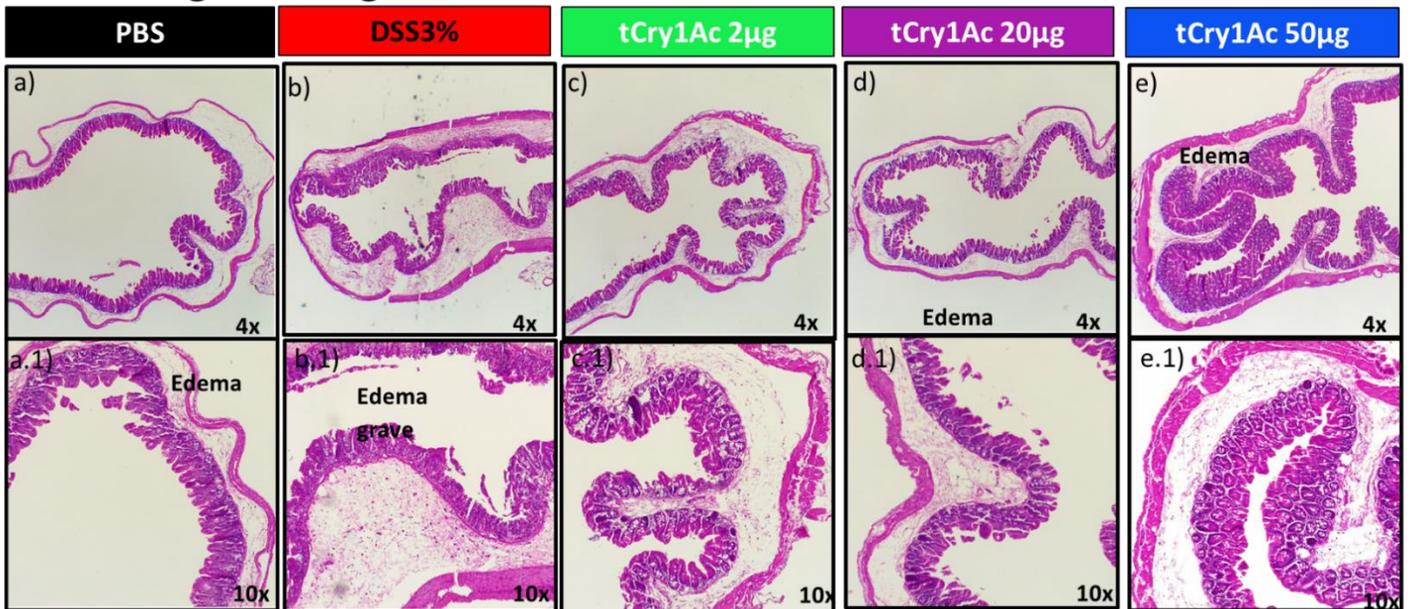


C)

Afectación del tejido	Puntaje	Características histopatológicas
Nulo	0	Sin cambios
Leve	1	Cambios leves
Moderada	2	Presencia en zonas localizadas
Grave	3	Cambios acentuados y evidentes

Figura 11. A) Imágenes de histología del colon con tinción H&E en donde se muestra una imagen representativa de cada grupo experimental con tres diferentes aumentos (10x, 20x y 40x) (n=4). a) imagen representativa de sección del colon del grupo tratado con PBS, aumento 40x a.1) aumento 10x a.2) aumento 4x. b) imagen representativa de sección del colon del grupo tratado con TCry1Ac 2µg, aumento 40x. b.1 aumento 10x. b.2) aumento 4x. c) imagen representativa de sección del colon del grupo tratado con TCry1Ac 20µg, aumento 40x, en esta imagen se puede apreciar edema, categorizado como leve, tal y como se muestra en la gráfica. c.1) aumento 10x. c.2) aumento 4x. d) imagen representativa de sección del colon del grupo tratado con TCry1Ac 50µg, aumento 40x, en ella se muestra una hiperplasia linfoide, la cual esta reportada en la gráfica histológica. b.1 aumento 10x. b.2) aumento 4x grupo. e) imagen representativa de sección del colon del grupo TCry1Ac 2µg, aumento 40x. b.1 aumento 10x. b.2) aumento 4x. B) Gráfico de barras que ilustra el análisis histopatológico, representando cada repetición de los distintos grupos de tratamiento. En esta gráfica, se destacan las características histopatológicas encontradas, identificadas mediante distintos colores: (azul) Hiperplasia linfoide, (amarillo) Linfangiectasia, (naranja) Formación de vasos sanguíneos, (verde) Enteritis linfoplasmocítica y neutrofílica, y (rojo) Edema. Cada característica se ha asignado un valor en función de su gravedad, como se detalla en la tabla etiquetada con la letra C).

A) Histología de ciego con H&E



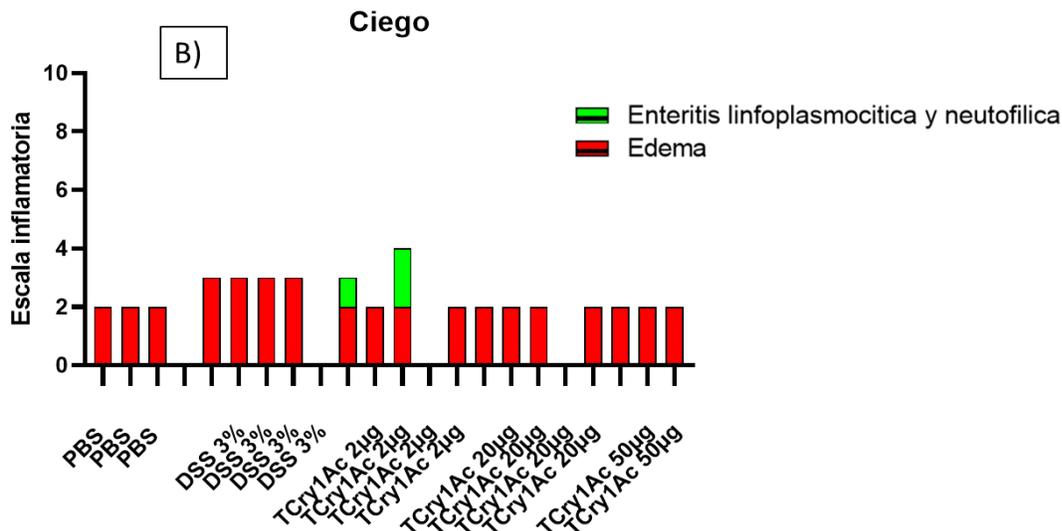


Figura 12 Imágenes de histología de la sección de ciego con tinción H&E, que presentan una representación gráfica de cada grupo experimental a tres diferentes aumentos (10x, 20x y 40x) (n=4). a) Imagen representativa de la sección del ciego del grupo tratado con PBS, aumento 40x. a.1) Aumento 10x. a.2) Aumento 4x. b) Imagen representativa de la sección del ciego del grupo tratado con DSS al 3%, aumento 40x. b.1) Aumento 10x. b.2) Aumento 4x. c) Imagen representativa de la sección del ciego del grupo tratado con TCry1Ac 2µg, aumento 40x. c.1) Aumento 10x. c.2) Aumento 4x. d) Imagen representativa de la sección del ciego del grupo tratado con TCry1Ac 20µg, aumento 40x. d.1) Aumento 10x. d.2) Aumento 4x. e) Imagen representativa de la sección del ciego del grupo TCry1Ac 50µg, aumento 40x. e.1) Aumento 10x. e.2) Aumento 4x. B) Gráfico de barras que ilustra el análisis histopatológico, representando cada repetición de los distintos grupos de tratamiento en la sección de ciego. En esta gráfica, se resaltan las características histopatológicas identificadas con diferentes colores (verde) Enteritis linfoplasmocítica y neutrofílica, y (rojo) Edema. Cada característica ha sido evaluada y se le ha asignado un valor según su gravedad, tal como se detalla en la tabla etiquetada con la letra en la figura 11C).

Comparación de la respuesta inflamatoria en células CD11b+ entre la toxina Cry1Ac y el control positivo con DSS

Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo muestran las células CD11b+, previamente obtenidas de lámina propia tanto del colon como del ciego. En los grupos tratados con toxina Cry1Ac, en las tres diferentes dosis evaluadas (2µg, 20µg y 50µg), se observó una leve disminución en el número de células CD11b+ en comparación con el grupo control negativo tratado con PBS. Sin embargo, esta disminución no alcanzó significancia estadística. Por el contrario, el grupo control positivo tratado con DSS mostró un aumento significativo en el número de células CD11b+ como era esperable según estudios previos (Figura 13). Los hallazgos sugieren que la administración de toxina Cry1Ac en diferentes dosis no induce un reclutamiento de células tipo CD11b+ en la lámina propia del intestino grueso en comparación con el grupo control positivo.

En el contexto de nuestro análisis mediante citometría de flujo, analizamos CX3CR1 en células CD11b+ en el colon y el ciego (Figura 13). Observamos un incremento significativo en la región CD11b+ CX3CR1^{low}, denominada como R1, en el grupo control positivo. Esta región está asociada con células recién reclutadas, mientras que la región CD11b+ CX3CR1^{high}, conocida como R2, representa células residentes. En el grupo control positivo, hubo una disminución estadísticamente significativa, de la región R2, como era de esperarse, ya que estos cambios son consistentes con los modelos de IBDs (Zhou, Dai et al., 2015). Sin embargo, al

comparar nuestros resultados del control positivo (DSS 3%) con los grupos tratados con la toxina Cry1Ac, no observamos diferencias significativas en los cambios en estas regiones, que en este análisis denominamos región 1 y región 2 (Figura 14 E, F).

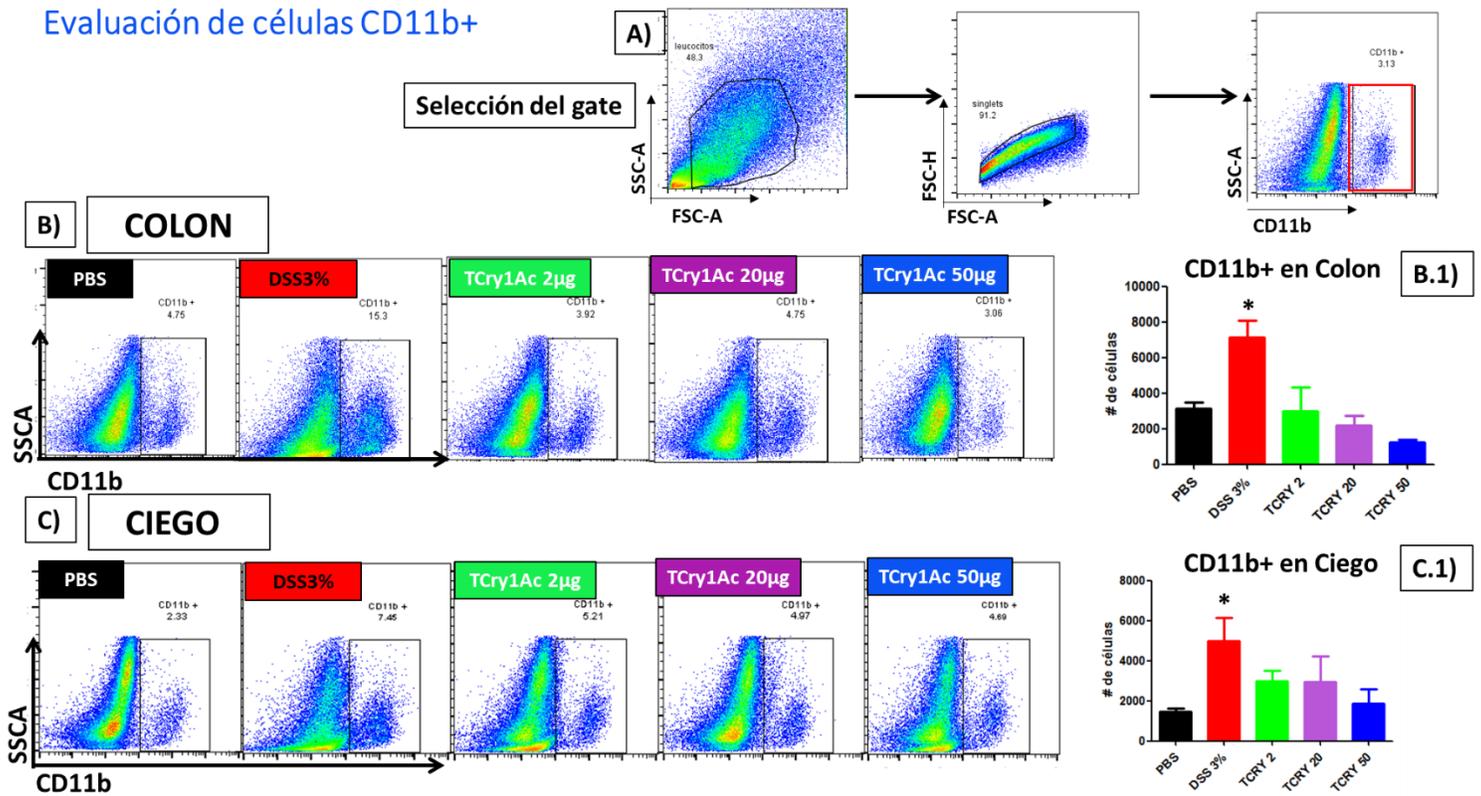


Figura 13 Analisis de CX3CR1 en células CD11b+. D) Selección del Gate a Partir de la Región CD11b+: Se Seleccionaron Dos Poblaciones, CX3CR1- (Denominadas "Recién Reclutadas") y CX3CR1+ (Denominadas "Residentes"). E) Dot plots representativos de colon de cada grupo, en donde se muestra el porcentaje de células CX3CR1-/CX3CR1+. E.1) Gráfico de Barras que Muestra el Porcentaje de Células a Partir de la Región de Células CD11b+ en colon: La Gráfica se Divide en Dos Poblaciones, CX3CR1- y CX3CR1+. F) Dot plots representativos de colon de cada grupo, en donde se muestra el porcentaje de células CX3CR1-/CX3CR1+. E.1) Gráfico de Barras que Muestra el Porcentaje de Células a Partir de la Región de Células CD11b+ en colon: La Gráfica se Divide en Dos Poblaciones, CX3CR1- y CX3CR1+. Los Datos se Presentan como Media \pm Desviación Estándar (n=4). Se Indica Diferencia Significativa en Comparación con el Grupo PBS (* $p < 0.05$).

Análisis de células CX3CR1-/CX3CR1+ en células CD11b+.

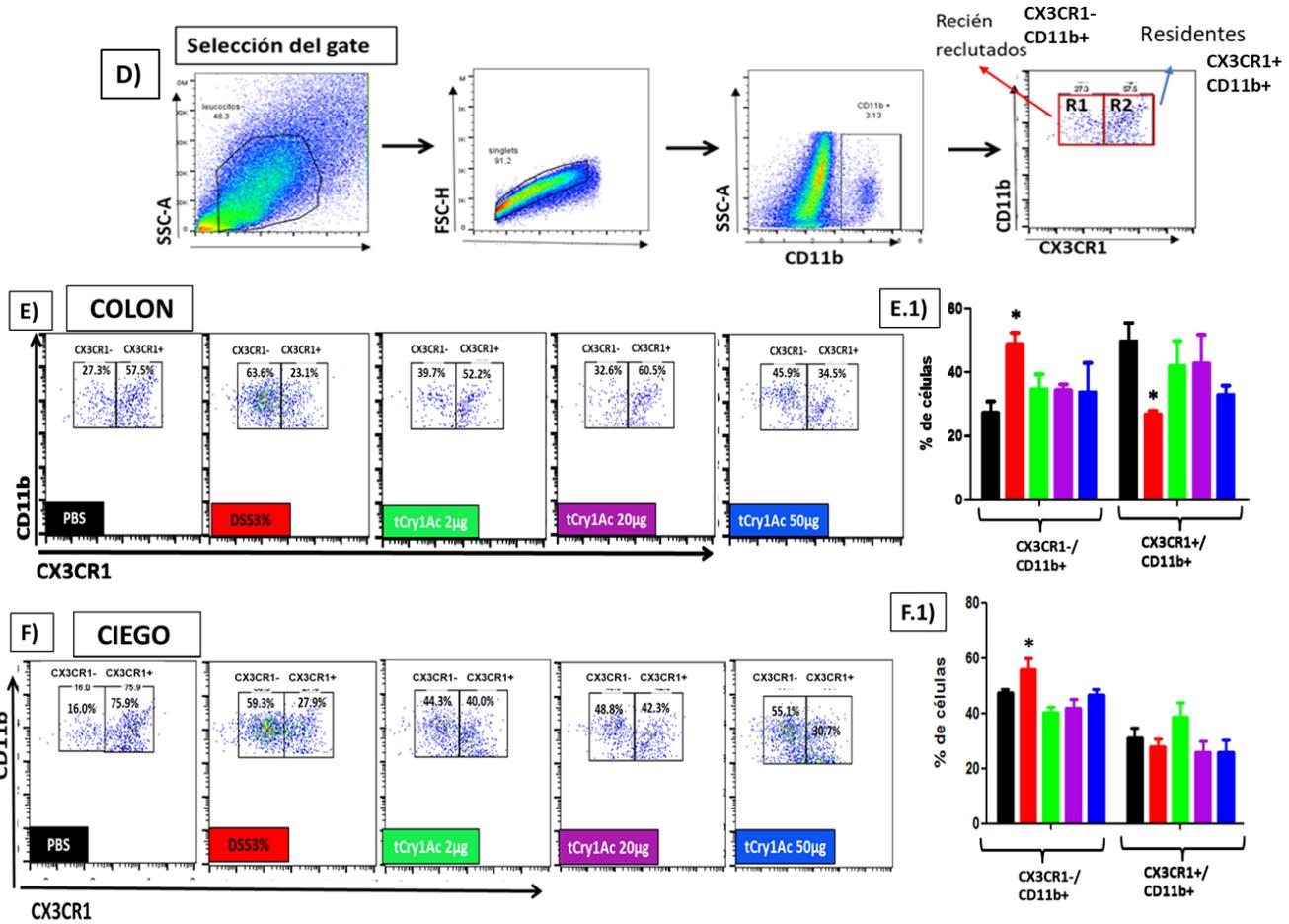
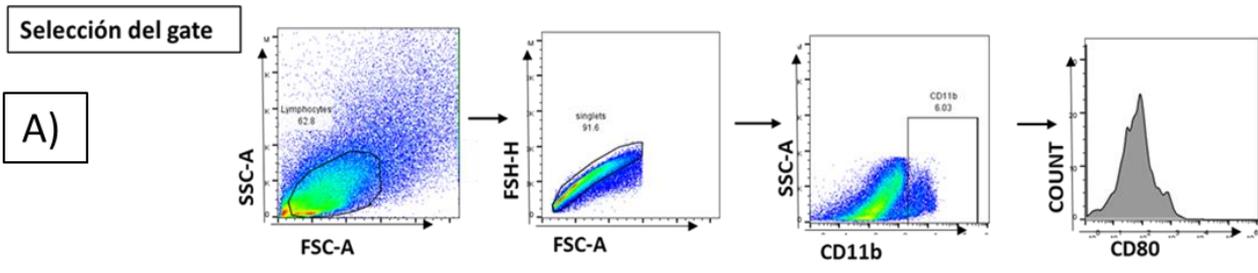


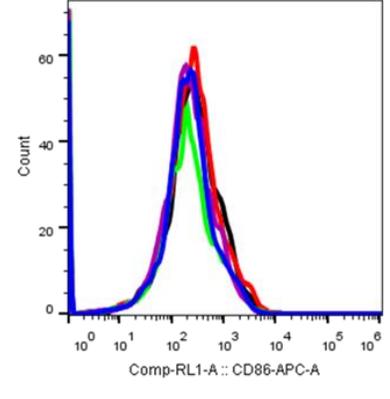
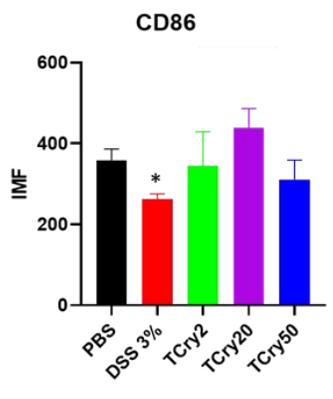
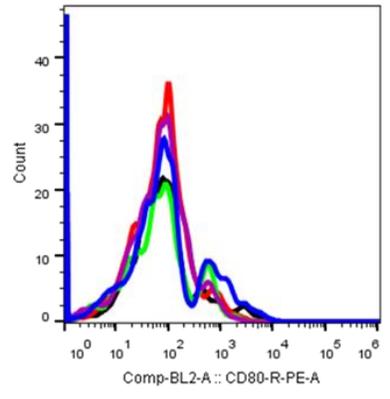
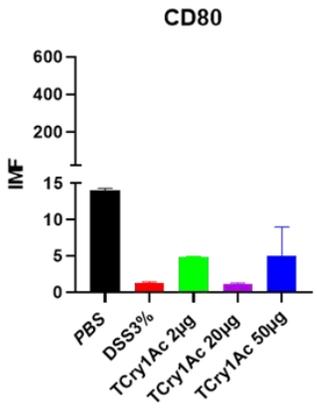
Figura 14 Análisis de CX3CR1 en células CD11b+. D) Selección del Gate a Partir de la Región CD11b+: Se Seleccionaron Dos Poblaciones, CX3CR1- (Denominadas "Recién Reclutadas") y CX3CR1+ (Denominadas "Residentes"). E) Dot plots representativos de colon de cada grupo, en donde se muestra el porcentaje de células CX3CR1-/CX3CR1+. E.1) Gráfico de Barras que Muestra el Porcentaje de Células a Partir de la Región de Células CD11b+ en colon: La Gráfica se Divide en Dos Poblaciones, CX3CR1- y CX3CR1+. F) Dot plots representativos de colon de cada grupo, en donde se muestra el porcentaje de células CX3CR1-/CX3CR1+. E.1) Gráfico de Barras que Muestra el Porcentaje de Células a Partir de la Región de Células CD11b+ en colon: La Gráfica se Divide en Dos Poblaciones, CX3CR1- y CX3CR1+. Los Datos se Presentan como Media \pm Desviación Estándar (n=4). Se Indica Diferencia Significativa en Comparación con el Grupo PBS (*p<0.05).

Evaluación de la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en células CD11b+.

Se evaluó la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en células CD11b+ de la lámina propia del colon y ciego (Figura 15). Los resultados indicaron que no hubo un aumento significativo en las moléculas coestimuladoras, CD80 y CD86 en las células CD11b+ del colon en los grupos tratados con TCry1Ac en comparación con el grupo con el grupo tratado con PBS.



B) Colon



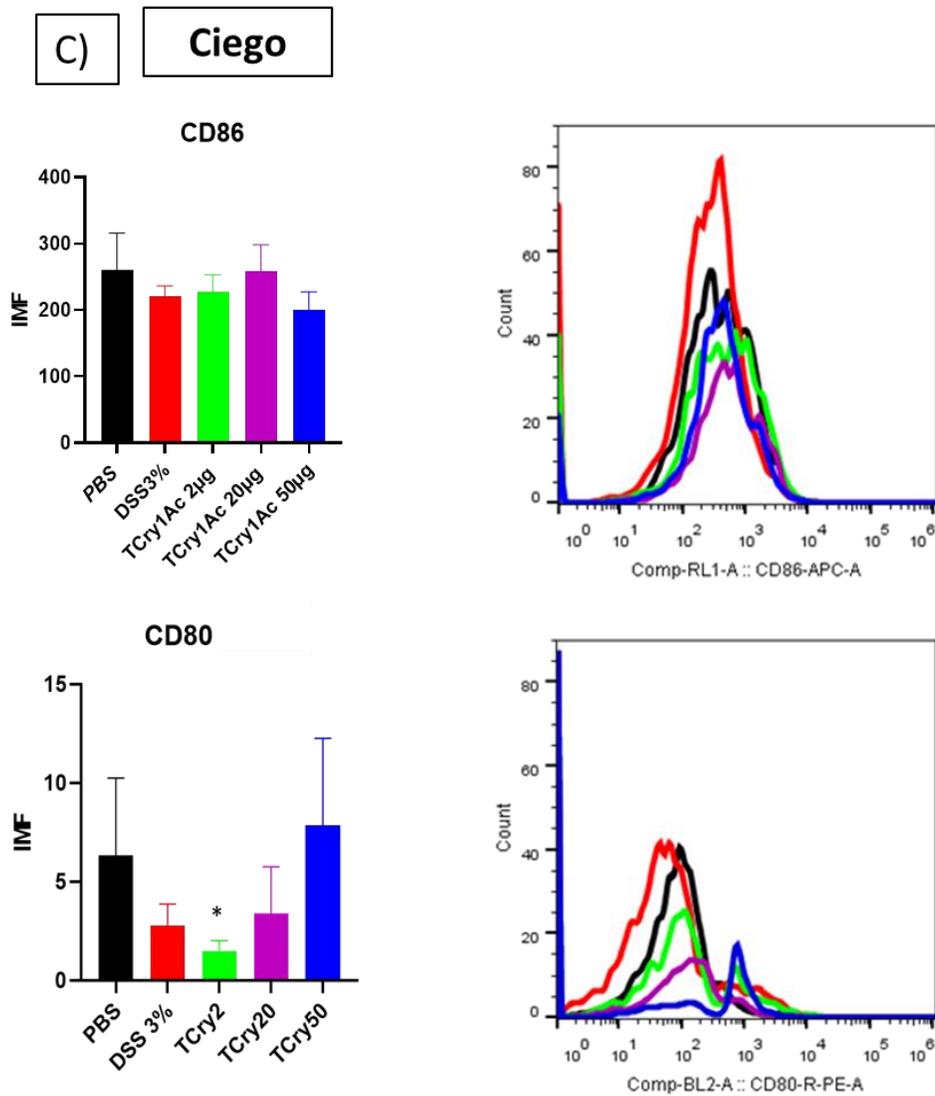


Figura 15 Evaluación de Moléculas Coestimuladoras CD80 y CD86 en Células de la Lámina Propia: A) Selección del Gate. B) Gráfico de Barras que Muestra la Intensidad de CD80 y CD86 en Células Provenientes de la Lámina Propia de la Porción del Colon. La Escala se Muestra por Intensidad Media de Fluorescencia. C) Gráfico de Barras que Muestra la Intensidad de CD80 y CD86 en Células de la Lámina Propia del Ciego, por Medio de Intensidad Media de Fluorescencia.

Análisis de CCR2 en células de lámina propia.

Se realizó un análisis de la presencia de células positivas para CCR2 en lámina propia de colon y ciego (Figura 16) en los grupos tratados con TCry1Ac y los controles. Aunque no fue estadísticamente significativo, se observó un aumento en los grupos TCry1Ac 2µg y TCry1Ac 20µg por número de células. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de células CCR2+ en la lámina propia de ciego entre los grupos tratados con la toxina. Es importante destacar la diferencia en el conteo de células CCR2+ entre colon, siendo el colon la región con mayor cantidad de células positivas para CCR2, lo que sugiere un mayor reclutamiento en cuanto a la llegada de monocitos o células provenientes de la circulación.

Análisis de CCR2.

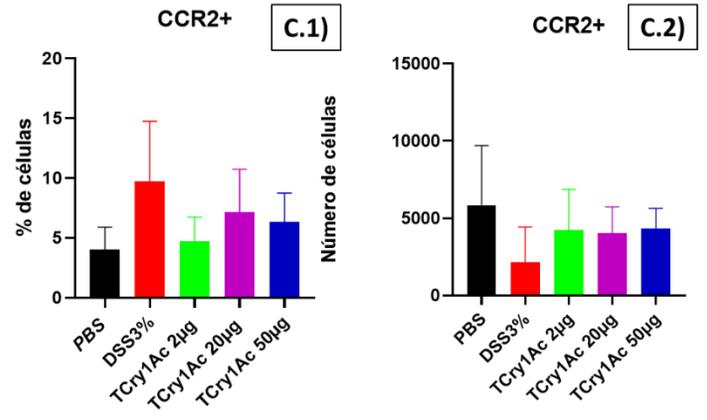
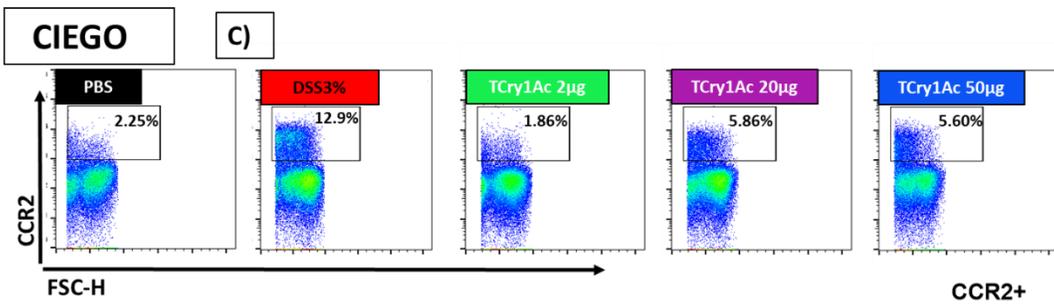
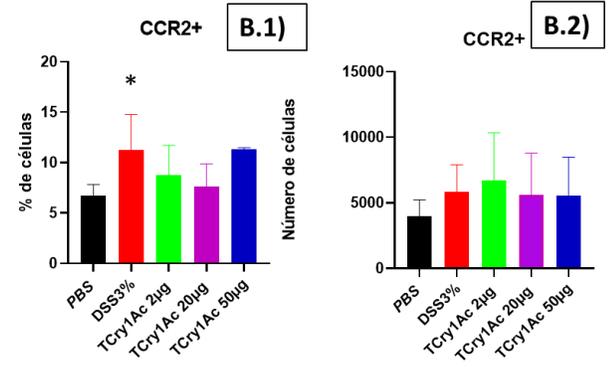
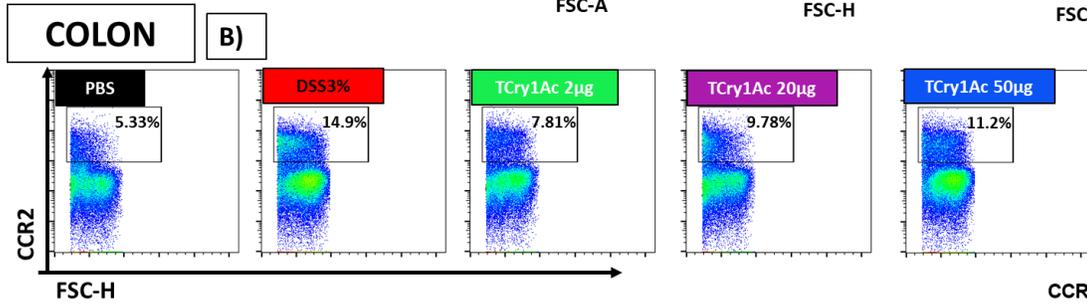
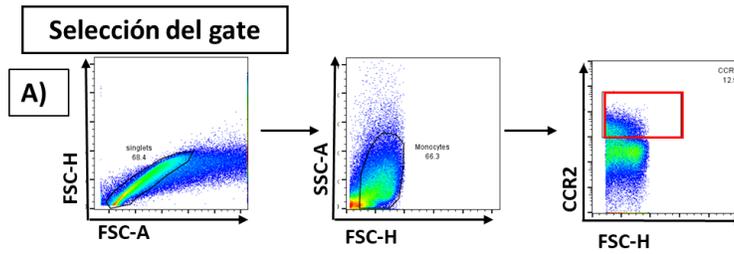


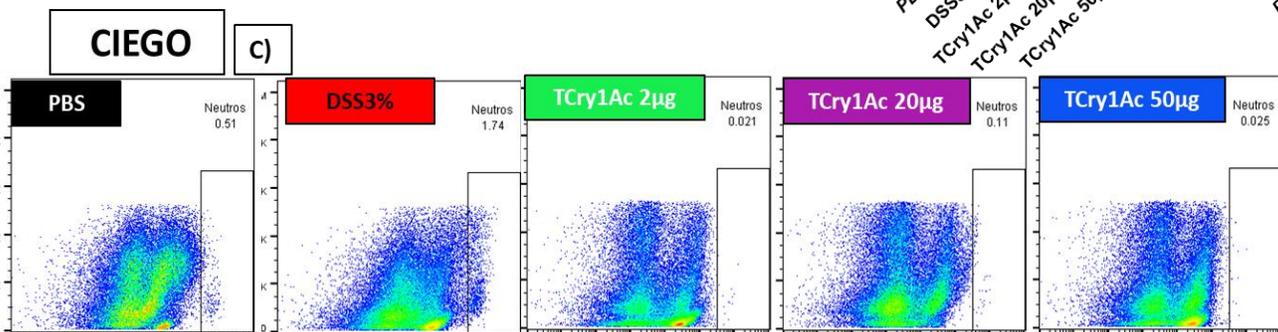
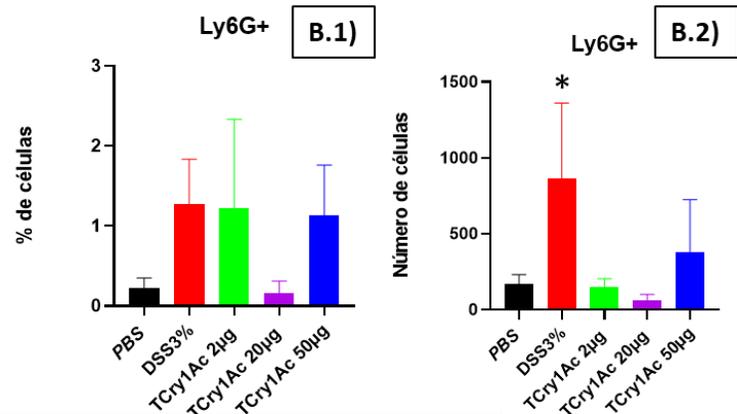
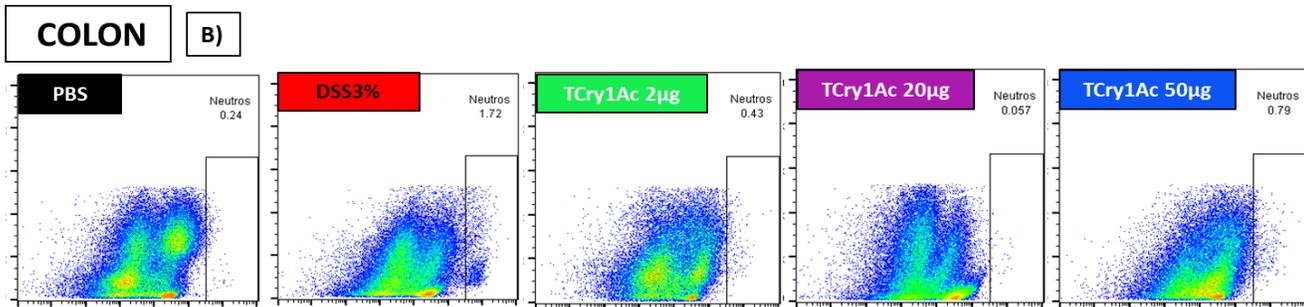
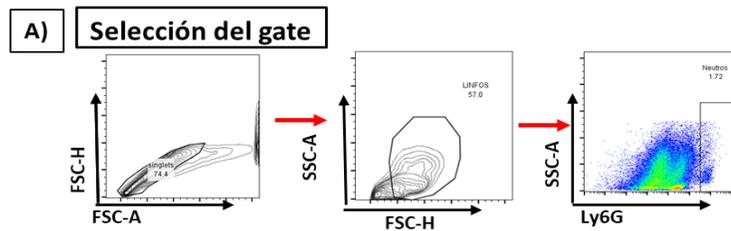
Figura 16 Análisis de Expresión de CCR2 en el Colon: A) Selección del Gate para Cuantificar las Células CCR2+. Dot plots representativos de cada grupo que muestran la región de células CCR2+ seleccionada mediante gate en el colon. B) Gráfica de Barras que Indica la Media de los Porcentajes de Células CCR2+ en Cada Grupo del Colon. Los Datos se Presentan como Media \pm Error Estándar de la Media (N=4). Estos Resultados Muestran una Mayor Presencia de Células CCR2+ en el Colon, con un Aumento Estadísticamente Significativo en el Grupo Tratado con TCry1Ac 50µg. Se Indica Diferencia Significativa en Comparación con el Grupo PBS (* $p < 0.05$).

Identificación de neutrófilos con Ly6G en colon.

El análisis mediante citometría de flujo utilizando Ly6G como marcador, reveló la presencia de una población distintiva de células Ly6G+ en la lámina propia tanto en colon como en ciego (Figura 17). Estas células identificadas como neutrófilos representan un tipo celular importante dentro de las enfermedades inflamatorias intestinales.

Para cuantificar y visualizar de manera efectiva esta población, se realizaron gráficos de barras que muestran el número y el porcentaje de células tanto en colon como en ciego. Se encontró que hubo un aumento estadísticamente significativo vs grupo tratado con PBS con número de células en el control positivo (grupo tratado con DSS), tal y como se esperaba, sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas en los grupos tratados con TCry1Ac en ninguna de las dosis. De acuerdo con los hallazgos presentados no encontramos cambios en el número ni porcentaje de neutrófilos tras la administración de la TCry1Ac.

Identificación de población neutrófilos con Ly6G



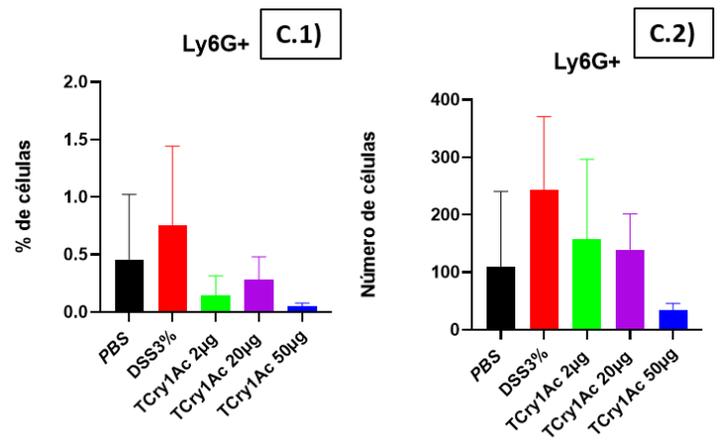


Figura 17 Población de células Ly6G+ en el colon y el ciego. La región Ly6G+ se destaca en cada gráfico, permitiendo la identificación y cuantificación de estas células en las muestras. A) Selección del gate. B) Dot plots representativos de la región Ly6G+ de colon, en donde se muestra la población seleccionada como Ly6G+. B.1) Gráficas de barras que representan el porcentaje de células Ly6G+ en relación con el total de células obtenidas de la lámina propia. B.2) Gráficas de barras que muestran el número total de células Ly6G+ en el colon, los datos se presentan como recuento absoluto de células Ly6G+ en cada muestra de lamina propia de colon. C) Dot plots representativos de la región Ly6G+ de ciego, en donde se muestra la población seleccionada como Ly6G+. C.1) Gráficas de barras que representan el porcentaje de células Ly6G+ en relación con el total de células obtenidas de la lámina propia. C.2) Gráficas de barras que muestran el número total de células Lv6G+ en el colon, los datos se presentan como recuento absoluto de células Lv6G+ en cada muestra de

Administración intragástrica de la toxina Cry1Ac: efectos sobre la población de células CD19+ y CD3+ en la lámina propia del intestino.

En el análisis de citometría de flujo se graficó el porcentaje de células CD19+ y CD3+ en la lámina propia después de la administración intragástrica de la toxina Cry1Ac y los controles, grupos tratados con PBS (control negativo) y DSS3% (control positivo).

Los resultados mostraron que la administración intragástrica de la toxina Cry1Ac parece tener un efecto selectivo en la población de células linfocitarias de la lámina propia. En el colon, no se observaron cambios significativos en el porcentaje de células CD19+, pero hubo un aumento en el porcentaje de células CD3+ en el grupo tratado con DSS, por otro lado, en el ciego (Figura 18) el grupo TCry1Ac 2µg presentó un aumento en el porcentaje de células CD19+, lo que podría indicar un posible papel de la toxina en la activación de células B en esta región.

general, estos resultados sugieren que la exposición a la toxina Cry1Ac puede tener un efecto selectivo en la población de células linfocitarias de la lámina propia en diferentes regiones del intestino. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar el mecanismo exacto detrás de estos en la población celular y su posible implicación en la patogénesis de la inflamación intestinal.

Identificación de células T y células B con marcadores CD3+ y CD19+.

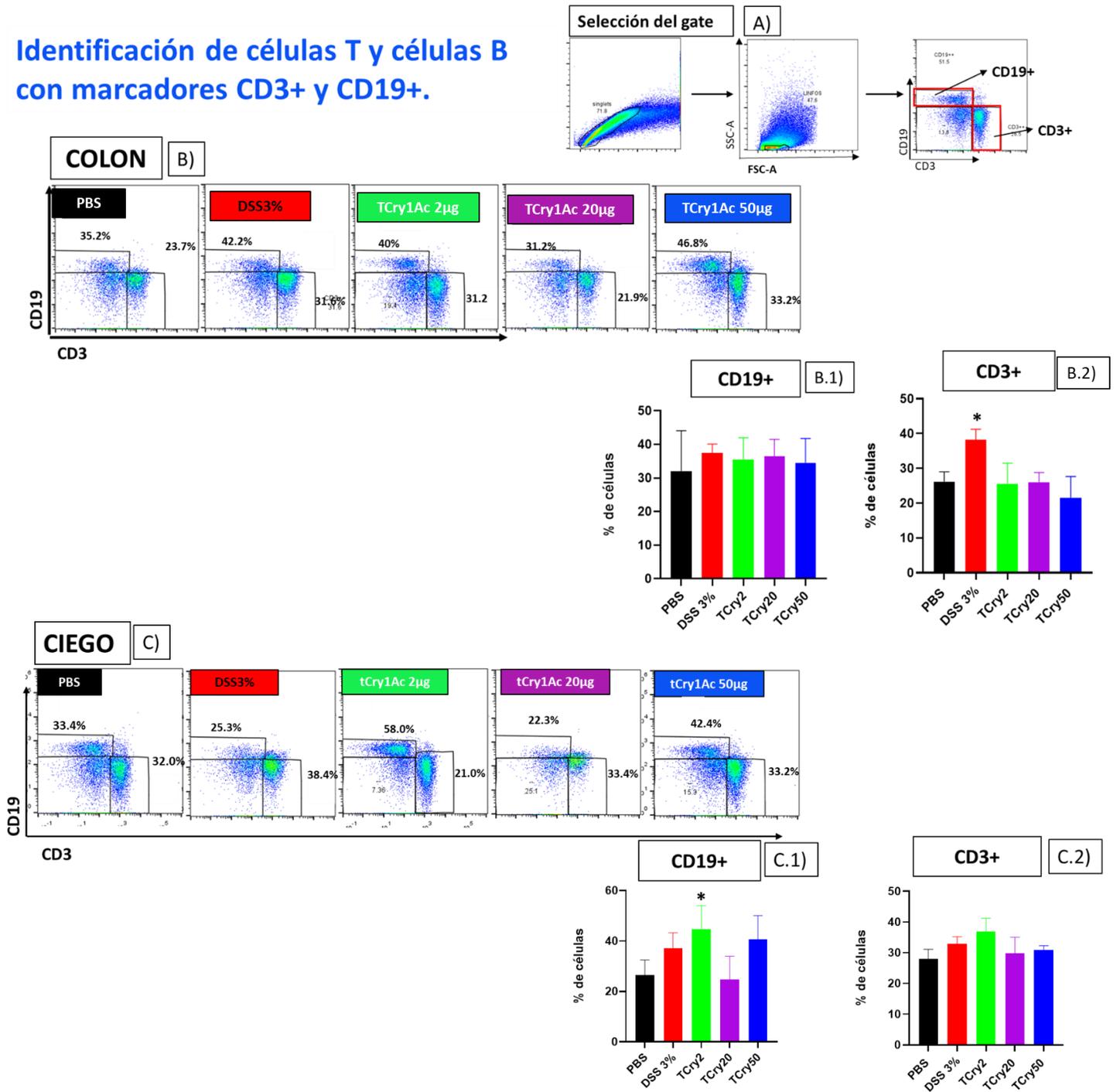


Figura 18 Identificación de células T y células B con marcadores CD3+ y CD19+ en colon. Selección del gate: En los Dot plots mostrados, se seleccionaron las regiones previas a la región final mediante la eliminación de singlets y la selección de células con un tamaño similar al de los linfocitos. Finalmente, se graficaron los marcadores CD19 vs CD3. A) Dot plots representativos de colon, en los que se muestran los porcentajes de células CD3+ y CD19+ en las regiones seleccionadas. A.1) Gráfica de barras que muestra la media de los porcentajes de células CD19+. C) Dot plots representativos de ciego, en los que se indica el porcentaje de células CD3+ y CD19+ en las regiones seleccionadas. C.1) Gráfica de barras que muestra la media de los porcentajes de células CD3+. C.2) Gráfica de barras que muestra los porcentajes de células CD19+. Gráfica de barras que muestra la media de los porcentajes de células CD3+. Diferencia significativa (* $p < 0.05$) en la comparación con el grupo control PBS.

Discusión

En este estudio, se evaluó el potencial inflamatorio intestinal de la administración intragástrica aguda de la Toxina Cry1Ac. En términos generales, los resultados indican que, bajo esta modalidad de administración, la toxina no provoca alteraciones inflamatorias intestinales.

En nuestra primera evaluación, llevamos a cabo mediciones de parámetros fisiológicos relacionados con la inflamación, los cuales reflejan las características clínicas y la gravedad de las enfermedades inflamatorias intestinales (Parang, et al., 2016). Entre los resultados obtenidos, destacó que la pérdida de peso en los grupos que recibieron TCry1Ac no mostró diferencias significativas a lo largo de los días de administración en las tres diferentes dosis evaluadas. Además, examinamos la longitud del intestino grueso y la presencia de sangre oculta en las heces, y tampoco observamos cambios notables en los grupos que fueron tratados con TCry1Ac. Estos resultados indican que la administración de diferentes concentraciones de TCry1Ac no condujo a una pérdida de peso significativa ni hallazgos clínicos relevantes, en contraste con el grupo tratado con DSS, que mostró cambios significativos.

Dado que las citocinas son los principales mediadores de la inflamación y la actividad reguladora en la mucosa intestinal, analizamos la capacidad de la TCry1Ac para alterar la producción de citocinas en tejido del intestino grueso. Se optó por realizar el análisis en tejido utilizando explantes en lugar de otras metodologías debido a que los explantes ofrecen un contexto más cercano a la situación *in vivo*. Los explantes permiten mantener la integridad de la estructura tisular y las interacciones celulares, lo que nos brinda información valiosa sobre el microambiente y sus interacciones, lo que influye en la respuesta inflamatoria en un contexto biológico más completo.

Dentro de nuestros resultados el grupo tratado con TCry1Ac 2µg tuvo un aumento significativo de TNF-α, tanto en colon como en ciego. Aunque este fue estadísticamente significativo hay que tener en cuenta que la desviación estándar específicamente de este grupo fue muy alta, por lo que se recomienda repetir el experimento en un futuro o el tamaño de la muestra. A pesar de lo anterior el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) está implicado directamente en la regulación de múltiples procesos inmunitarios, incluida la activación de células inflamatorias y la producción de otras citocinas. (Pugliese et al., 2017) La inhibición de TNF-α mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos (anti TNF-α) ha demostrado ser eficaz en el control de la inflamación y la mejora de síntomas clínicos en pacientes con IBDs. (Zhou, Dai, & Liu, 2015). Por lo que su aumento está relacionado con la perpetuación de la inflamación crónica y al daño tisular en el intestino, (Neurath et al., 1997) (Lopetuso et al., 2020). Sin embargo, no observamos un aumento estadísticamente significativo en nuestro control positivo (DSS), esto podría estar relacionado con otras citocinas: TNF-α es parte de una red de citocinas inflamatorias que se regulan entre sí. Es posible que otros mediadores de la inflamación estén influyendo en los niveles de TNF-α, lo que podría enmascarar un aumento significativo.

Otra citocina de importancia en la respuesta inflamatoria intestinal es la interleucina-10 (IL-10), esta citocina desempeña un papel fundamental en la modulación de las respuestas inmunitarias en el intestino (Asadullah, Sterry, & Volk, 2003). Se considera una citocina antiinflamatoria, es producida por diferentes tipos de células, como células T reguladoras, células epiteliales, macrófagos, células dendríticas y células B (Asadullah et al., 2003). Se ha demostrado que desempeña funciones importantes en la diferenciación de células B y la producción de inmunoglobulinas, así como en la supresión de la activación de macrófagos para controlar la inflamación (Calum C. Bain, 2014). La disminución de los niveles de IL-10 se ha asociado con la pérdida de tolerancia oral (Xiong, et al., 2022) y se ha observado que ratones knock-out para IL-10 desarrollan CU de forma crónica (Kühn, et al., 1993). Estos hallazgos subrayan la relevancia central de esta citocina en la regulación negativa de las respuestas inflamatorias intestinales, convirtiendo su reducción en un marcador crítico de la tolerancia intestinal.

Por lo anterior resulta notable la reducción estadísticamente significativa en los niveles de IL-10 encontrados en el colon de todos los grupos a los que se les administró TCry1Ac por vía intragástrica en comparación con el grupo de control negativo (PBS). Estos resultados concuerdan con la disminución de esta interleucina

observada en el grupo de control positivo (DSS). Además, se observó un efecto similar en el ciego, donde se evidenció una disminución de esta interleucina en todos los grupos tratados con TCry1Ac, con la excepción del grupo que recibió la dosis de 50µg de Tcry1Ac.

Aunque no se encontraron diferencias entre la producción de la interleucina IL-1β ni IL-6, es importante señalar la razón por la que se decidió cuantificar estas citocinas, durante el presente estudio. Estas citocinas, en particular, son conocidas por desempeñar un papel crucial en la respuesta inflamatoria y homeostasis en el intestino (Kim, 2011). Su producción aumenta en situaciones de inflamación, y su medición puede proporcionar información valiosa sobre el estado de la respuesta inmunológica local.

Además, la evaluación de múltiples citocinas nos brinda una imagen más completa de la respuesta inmunológica en el intestino grueso y puede ayudar a identificar posibles interacciones o modulaciones entre diferentes mediadores inflamatorios. Por lo tanto, aunque no se observaron diferencias en estas dos citocinas en particular, su medición en este contexto sigue siendo relevante para comprender mejor la respuesta inflamatoria inducida por la TCry1Ac y su posible impacto en la homeostasis intestinal.

En cuanto a las citocinas a nivel sistémico, se ha reportado en estudios previos la capacidad de la TCry1Ac para alterar el perfil de citocinas en suero, a partir de una administración intragástrica (Santos-Vigil et al., 2018), además se han evaluado diferentes rutas de inmunización por vías mucosales, para determinar la inmunogenicidad de las proteínas Cry1Ac, en dicho estudio se encontró un aumento estadísticamente significativo de la producción IgG en suero, después de la inmunización intraperitoneal de dicha proteína. (G. G. Guerrero, et al., 2004). Estos hallazgos respaldan la relevancia de evaluar las citocinas en suero como marcadores de respuesta inmunológica sistémica en relación con la administración de TCry1Ac.

A pesar de los antecedentes nuestros resultados muestran que, la administración de TCry1Ac en este contexto particular no tuvo un impacto apreciable en los niveles de estas citocinas en el suero de ninguna de las citocinas evaluadas (IL-10, IL-6, IL-β y TNF-α). La posible hipótesis para la falta de cambios significativos en los niveles de citocinas en el suero tras la administración de TCry1Ac podría ser que la respuesta inmunitaria en el intestino y las mucosas sea más específica y localizada, y no necesariamente se refleje de manera inmediata en el suero, además hay que tomar en cuenta que esta investigación se llevó a cabo con un esquema agudo, por lo que no se descarta que en un esquema crónico pueda desencadenar cambios en los niveles de citocinas en suero. Sin embargo, es necesaria investigaciones adicionales para confirmar o refutar lo anterior.

Con el fin de realizar un estudio completo, se llevó a cabo un análisis histopatológico exhaustivo tras la administración intragástrica de TCry1Ac. Los cortes histológicos de ambas secciones del intestino grueso fueron examinados y se les asignó una puntuación basada en las características histopatológicas relacionadas con la inflamación, llamado índice de actividad histológica (IAH) usado para cuantificar el daño histológico, en donde se considera en una escala visual: (0) inactiva/ausente, (1) leve, (2) moderada o (3) acentuada/grave. (Mosli et al., 2017)

En este análisis, solo se observaron hiperplasias linfoides leves en los grupos que recibieron TCry1Ac en colon, en contraste con el grupo de control positivo, que exhibió manifestaciones histológicas mucho más graves, como edema, linfangiectasia, enteritis linfoplasmocítica, la formación de nuevos vasos sanguíneos en un grado severo y pérdida de la arquitectura de las criptas. Las hiperplasias linfoides leves puede ser una respuesta a estímulos infecciosos o inflamatorios y suelen caracterizarse por un incremento moderado en la cantidad de células linfoides, sin que se llegue a considerar una condición patológica grave. Su presencia puede indicar una respuesta del sistema inmunológico a la exposición a antígenos o patógenos, y generalmente se resuelven de forma espontánea. (Kim, 2011), y se ha propuesto como un indicador de inflamación de bajo grado. (Albuquerque, 2014).

En cuanto a la porción del ciego, se encontró edema en todos los grupos, incluyendo el control positivo (DSS) y el control negativo (PBS). Se presume que una de las razones de esta característica común podría estar

relacionada con la técnica metodológica utilizada para seccionar las porciones del ciego del intestino grueso. Sin embargo, la razón detrás de la ausencia de manifestaciones histológicas más graves en el ciego en comparación con el colon podría deberse a las diferencias anatómicas y funcionales entre estas dos regiones del intestino grueso. Se ha observado que el modelo de inflamación intestinal DSS utilizado en este proyecto tiene un efecto más pronunciado en el colon en comparación con el ciego. En conclusión, no se observaron características inflamatorias contundentes que relacionen la administración intragástrica de la TCry1Ac con alteraciones histopatológicas relacionadas con inflamación intestinal. Sin embargo en un estudio se reportó al evaluar el efecto alergénico de TCry1Ac con un esquema de administración intragástrica 1 vez por semana con 50µg por 7 semanas y un reto antigénico posterior inducía hiperplasia linfoide en colon, con abundante infiltrado linfocitario, además de otros cambios como enteritis linfoplasmocítica, hiperplasia de células caliciformes, edema y desprendimiento epitelial (Santos-Vigil et al., 2018), por lo que no podemos descartar sus posibles efectos histopatológicos a largo plazo.

Dentro del análisis por citometría en este estudio, se emplearon diferentes marcadores con propósitos específicos. El primer enfoque se centró en el marcador CD11b, en donde se evaluó el número de células CD11b+ en lamina propia en colon y en ciego. Las células CD11b+, como los macrófagos y los neutrófilos, son conocidas por su capacidad de fagocitar patógenos y material celular dañado, lo que sugiere una respuesta a la presencia de amenazas infecciosas o inflamatorias en el intestino. Además, CD11b es un marcador típico de la inmunidad innata, lo que significa que estas células son fundamentales para la detección temprana de patógenos y la activación de respuestas inmunitarias. En el contexto de IBDs, como la enfermedad de Crohn y la CU, el aumento de células CD11b puede estar relacionado con la inflamación crónica y la infiltración de células, contribuyendo así a la respuesta inflamatoria persistente (de Aguiar, 2018).

Bajo este contexto el análisis de células CD11b+ es un importante indicador de inflamación intestinal, sin embargo, los resultados mostraron que el único grupo que tuvo un aumento estadísticamente significativo fue el tratado con DSS (control positivo).

Por otro lado, se evaluó CD11b vs CX3CR1. En donde se analizaron dos poblaciones distintas: las células CD11b+/CX3CR1⁻, posiblemente indicando que son células CD11b+ recién reclutadas y, por ende, identificadas como inflamatorias. Por otro lado, la subpoblación CD11b+/CX3CR1⁺ consiste en células residentes. Dentro de este análisis no se encontró un aumento de la población CD11b+/CX3CR1⁻ en ninguno de los grupos a los que se les administro la TCry1Ac vía intragástrica, mientras que el DSS tuvo un aumento de este marcador, al igual que en la región CD11b+/CX3CR1⁺ en donde el DSS tuvo un aumento significativo lo que corresponde a la región de células recién reclutadas, dicha región se ha visto aumentadas en diferentes modelos de inflamación intestinal (He et al., 2019).

Por otro lado, al evaluar las células provenientes de la lámina propia y positivas para CCR2, no se observó un incremento estadísticamente significativo en los grupos tratados con TCry1Ac. Sin embargo, es importante destacar que el aumento en las células CCR2+ en la lámina propia tiene implicaciones potencialmente significativas en el contexto del sistema inmunológico intestinal. CCR2 es un receptor de quimiocina que se encuentra en la superficie de ciertas células, como los monocitos y los macrófagos. La quimiocina CCR2 se une a CCL2 (también conocida como MCP-1), una quimiocina secretada que actúa como señal quimiotáctica para atraer células del sistema inmunológico, en particular monocitos, hacia áreas de inflamación o lesiones (Rahabi, et al., 2020). Aunque no se observaron diferencias estadísticas en este estudio, la presencia de células CCR2+ podría tener implicaciones sutiles en la respuesta inmunológica intestinal, lo que sugiere la necesidad de investigaciones adicionales para comprender completamente su papel en este contexto.

Estudios previos han demostrado que la protoxina es un potente inmunógeno, capaz de activar células como macrófagos mediante la sobre expresión de moléculas coestimuladoras, así como la quimiocina MCP-1, cuando se administra por vía intranasal e intraperitoneal (L. Moreno-Fierros et al., 2013), también se ha demostrado la capacidad de la toxina Cry1Ac para inducir la activación de macrófagos, provocando una la regulación a la alza de las moléculas CD80 y CD86 (M. Torres-Martínez et al., 2016). Sin embargo en el

presente estudio no se evidencio un aumento en estas moléculas coestimuladoras, esto podría deberse a que los ratones C57BL utilizados en este estudios fueron sacrificados 7 días después de la primera administración de la TCry1Ac, por lo que la activación de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 pudo disminuir en días posteriores, sin embargo se recomienda que en estudios posteriores se cuantifiquen estas moléculas en periodos cortos después de su administración, con el objetivo de corroborar que las TCry1Ac no las activas a nivel intestinal.

A continuación, se evaluó el reclutamiento de granulocitos Ly6G+ mediante citometría de flujo, y si bien no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en este parámetro en particular, es esencial considerar que la evaluación de un único marcador puede no ser suficiente para obtener una imagen completa de las poblaciones de neutrófilos y su papel en el contexto de la inflamación intestinal.

Se ha documentado que el aumento en el reclutamiento de granulocitos, como los neutrófilos, desempeña un papel fundamental en el inicio y la perpetuación de la inflamación en los tejidos del colon (Chulkina, Pichugin, & Ataullakhanov, 2020). Sin embargo, la regulación de este proceso puede ser compleja y multifactorial, involucrando la interacción de diversos marcadores y moléculas de señalización.

Por último, en nuestros resultados, llevamos a cabo la cuantificación de células B y T mediante citometría. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas con respecto al grupo tratado con PBS. De este modo, podemos concluir que no se está produciendo un reclutamiento activo al administrar TCry1Ac por vía intragástrica.

Se sugiere una caracterización más detallada de las poblaciones celulares evaluadas mediante citometría de flujo, utilizando marcadores adicionales como CD45, MHCII, Ly6C y F4/80, lo que podría proporcionar una imagen más completa de la respuesta inmunológica en el intestino grueso y ayudar a identificar posibles cambios sutiles en las poblaciones celulares, también se sugiere que en estudios posteriores se aumente el número de repeticiones.

Además, sería beneficioso realizar un estudio con una exposición a TCry1Ac durante un período de tiempo más prolongado para evaluar si los efectos, en caso de existir, se manifiestan con el tiempo. Esto permitiría una evaluación más completa de los efectos a largo plazo de la TCry1Ac en el intestino y su potencial impacto en la salud intestinal. En conjunto, estos enfoques podrían arrojar luz sobre las complejas interacciones entre la TCry1Ac y el sistema inmunológico intestinal.

Finalmente, este estudio tiene como objetivo fomentar la investigación sobre las proteínas Cry, dado que en los últimos años se ha aprobado el consumo de alimentos que las contienen. Además, con el creciente aumento de los OGM, es de vital importancia continuar realizando bioensayos que garanticen la bioseguridad de los alimentos. Así, se promueve una mayor comprensión de los efectos y la seguridad de estas proteínas.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en esta investigación, la administración intragástrica de la TCry1Ac no provocó signos asociados con inflamación intestinal.

Referencias

Uncategorized References

- Adel-Patient, K., Guimaraes, V. D., Paris, A., Drumare, M. F., Ah-Leung, S., Lamourette, P., . . . Wal, J. M. (2011). Immunological and metabolomic impacts of administration of Cry1Ab protein and MON 810 maize in mouse. *PLoS One*, *6*(1), e16346. doi:10.1371/journal.pone.0016346
- Albuquerque, A. (2014). Nodular lymphoid hyperplasia in the gastrointestinal tract in adult patients: A review. *World J Gastrointest Endosc*, *6*(11), 534-540. doi:10.4253/wjge.v6.i11.534
- Aldemita, R. R., Reaño, I. M., Solis, R. O., & Hautea, R. A. (2015). Trends in global approvals of biotech crops (1992-2014). *GM Crops Food*, *6*(3), 150-166. doi:10.1080/21645698.2015.1056972
- Asadullah, K., Sterry, W., & Volk, H. D. (2003). Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev*, *55*(2), 241-269. doi:10.1124/pr.55.2.4
- Bawa, A. S., & Anilakumar, K. R. (2013). Genetically modified foods: safety, risks and public concerns-a review. *J Food Sci Technol*, *50*(6), 1035-1046. doi:10.1007/s13197-012-0899-1
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol*, *41*(7), 423-431. doi:10.1016/j.ibmb.2011.02.006
- Briefs, I. J. I. b. (2017). Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: Biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years. *53*, 25-26.
- Calum C. Bain, A. M. M. (2014). Macrophages in intestinal. *Immunol Rev*, 102-117.
- Chulkina, M. M., Pichugin, A. V., & Ataulkhanov, R. I. (2020). Pharmaceutical grade synthetic peptide Thr-Glu-Lys-Lys-Arg-Arg-Glu-Thr-Val-Glu-Arg-Glu-Lys-Glu ameliorates DSS-induced murine colitis by reducing the number and pro-inflammatory activity of colon tissue-infiltrating Ly6G(+) granulocytes and Ly6C(+) monocytes. *Peptides*, *132*, 170364. doi:10.1016/j.peptides.2020.170364
- Delaney, B., Astwood, J. D., Cunny, H., Conn, R. E., Herouet-Guicheney, C., Macintosh, S., . . . Levine, M. (2008). Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food Chem Toxicol*, *46 Suppl 2*, S71-97. doi:10.1016/j.fct.2008.01.045
- Dhanaraj, A. L., Willse, A. R., & Kamath, S. P. (2019). Stability of expression of Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins in Bollgard-II hybrids at different stages of crop growth in different genotypes across cropping seasons and multiple geographies. *Transgenic Res*, *28*(1), 33-50. doi:10.1007/s11248-018-0102-1
- Finamore, A., Roselli, M., Britti, S., Monastra, G., Ambra, R., Turrini, A., & Mengheri, E. (2008). Intestinal and peripheral immune response to MON810 maize ingestion in weaning and old mice. *J Agric Food Chem*, *56*(23), 11533-11539. doi:10.1021/jf802059w
- Fleming, D., Musser, F., Reisig, D., Greene, J., Taylor, S., Parajulee, M., . . . Little, N. (2018). Effects of transgenic Bacillus thuringiensis cotton on insecticide use, heliothine counts, plant damage, and cotton yield: A meta-analysis, 1996-2015. *PLoS One*, *13*(7), e0200131. doi:10.1371/journal.pone.0200131
- González-González, E., García-Hernández, A. L., Flores-Mejía, R., López-Santiago, R., & Moreno-Fierros, L. J. V. m. (2015). The protoxin Cry1Ac of Bacillus thuringiensis improves the protection conferred by intranasal immunization with Brucella abortus RB51 in a mouse model. *175*(2-4), 382-388.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Puzstai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., & Cygler, M. (1995). Bacillus thuringiensis CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol*, *254*(3), 447-464. doi:10.1006/jmbi.1995.0630
- Guerrero, D. D., L. Moreno-Fierro. (2004). Implicación estructural de la respuesta inmune inducida por proteínas cry de Bacillus thuringiensis: papel de la región N-terminal. *Mol. Immunol*, 1177 - 1183.
- Guerrero, G. G., Dean, D. H., & Moreno-Fierros, L. (2004). Structural implication of the induced immune response by Bacillus thuringiensis Cry proteins: role of the N-terminal region. *Mol Immunol*, *41*(12), 1177-1183. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.026
- Haslberger, A. G. (2006). Need for an "integrated safety assessment" of GMOs, linking food safety and environmental considerations. *J Agric Food Chem*, *54*(9), 3173-3180. doi:10.1021/jf0511650
- He, J., Song, Y., Li, G., Xiao, P., Liu, Y., Xue, Y., . . . Wang, Q. (2019). Fbxw7 increases CCL2/7 in CX3CR1hi macrophages to promote intestinal inflammation. *J Clin Invest*, *129*(9), 3877-3893. doi:10.1172/jci123374

- Holmes, A. J., Chew, Y. V., Colakoglu, F., Cliff, J. B., Klaassens, E., Read, M. N., . . . Simpson, S. J. (2017). Diet-Microbiome Interactions in Health Are Controlled by Intestinal Nitrogen Source Constraints. *Cell Metab*, 25(1), 140-151. doi:10.1016/j.cmet.2016.10.021
- Hug, K. (2008). Genetically modified organisms: do the benefits outweigh the risks? *Medicina (Kaunas)*, 44(2), 87-99.
- Ibarra-Moreno, C. D., Ilhuicatz-Alvarado, D., & Moreno-Fierros, L. (2021). Differential capability of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin and toxin to induce in vivo activation of dendritic cells and B lymphocytes. *Dev Comp Immunol*, 121, 104071. doi:10.1016/j.dci.2021.104071
- Kennedy, R. D., Cheavegatti-Gianotto, A., de Oliveira, W. S., Lirette, R. P., & Hjelle, J. J. (2018). A General Safety Assessment for Purified Food Ingredients Derived From Biotechnology Crops: Case Study of Brazilian Sugar and Beverages Produced From Insect-Protected Sugarcane. *Front Bioeng Biotechnol*, 6, 45. doi:10.3389/fbioe.2018.00045
- Kim, J. M. (2011). [Inflammatory bowel diseases and inflammasome]. *Korean J Gastroenterol*, 58(6), 300-310. doi:10.4166/kjg.2011.58.6.300
- Koul, B., Yadav, R., Sanyal, I., & Amla, D. V. (2015). Comparative performance of modified full-length and truncated *Bacillus thuringiensis*-cry1Ac genes in transgenic tomato. *Springerplus*, 4, 203. doi:10.1186/s40064-015-0991-x
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., & Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75(2), 263-274. doi:10.1016/0092-8674(93)80068-p
- Liu, S., Wang, S., Wu, S., Wu, Y., & Yang, Y. (2020). Proteolysis activation of Cry1Ac and Cry2Ab protoxins by larval midgut juice proteases from *Helicoverpa armigera*. *PLoS One*, 15(1), e0228159. doi:10.1371/journal.pone.0228159
- Lopetuso, L. R., Corbi, M., Scaldaferrri, F., Petito, V., Graziani, C., Castri, F., . . . Papa, A. (2020). Characterization of mucosal cytokine profile in ulcerative colitis patients under conventional and anti-TNF- α treatment. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 32(12), 1527-1532. doi:10.1097/meg.0000000000001933
- Magalhaes, J. G., Tattoli, I., & Girardin, S. E. (2007). The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol*, 19(2), 106-115. doi:10.1016/j.smim.2006.12.006
- Mendoza-Almanza, G., Esparza-Ibarra, E. L., Ayala-Luján, J. L., Mercado-Reyes, M., Godina-González, S., Hernández-Barrales, M., & Olmos-Soto, J. J. T. (2020). The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: From insects to human cancer cells. 12(5), 301.
- Mitsialis, V., Wall, S., Liu, P., Ordovas-Montanes, J., Parmet, T., Vukovic, M., . . . Konnikova, L. (2020). Single-Cell Analyses of Colon and Blood Reveal Distinct Immune Cell Signatures of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 159(2), 591-608.e510. doi:10.1053/j.gastro.2020.04.074
- Moreno-Fierros, L., García-Hernández, A. L., Ilhuicatz-Alvarado, D., Rivera-Santiago, L., Torres-Martínez, M., Rubio-Infante, N., & Legorreta-Herrera, M. (2013). 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(4), 1051-1066. doi:10.1016/j.intimp.2013.10.005
- Moreno-Fierros, L., García, N., Gutiérrez, R., López-Revilla, R., & Vázquez-Padrón, R. I. (2000). 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 and Infection*, 2(8), 885-890. doi:[https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00398-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00398-1)
- Moreno-Fierros, L., Ruiz-Medina, E. J., Esquivel, R., Lopez-Revilla, R., & Piña-Cruz, S. (2003). Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand J Immunol*(57), 45-55.
- Mosli, M. H., Parker, C. E., Nelson, S. A., Baker, K. A., MacDonald, J. K., Zou, G. Y., . . . Jairath, V. (2017). Histologic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*, 5(5), Cd011256. doi:10.1002/14651858.CD011256.pub2
- Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, 3(4), 331-341. doi:10.1038/nri1057
- Neurath, M. F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 14(5), 329-342. doi:10.1038/nri3661
- Neurath, M. F., Fuss, I., Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Haralambous, S., Meyer zum Büschenfelde, K. H., . . . Kollias, G. (1997). Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol*, 27(7), 1743-1750. doi:10.1002/eji.1830270722

- Parang, B., Barrett, C. W., & Williams, C. S. (2016). AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods Mol Biol*, 1422, 297-307. doi:10.1007/978-1-4939-3603-8_26
- Pugliese, D., Felice, C., Papa, A., Gasbarrini, A., Rapaccini, G. L., Guidi, L., & Armuzzi, A. (2017). Anti TNF- α therapy for ulcerative colitis: current status and prospects for the future. *Expert Rev Clin Immunol*, 13(3), 223-233. doi:10.1080/1744666x.2017.1243468
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb j*, 22(3), 659-661. doi:10.1096/fj.07-9574LSF
- Rubio-Infante, N., & Moreno-Fierros, L. (2016). An overview of the safety and biological effects of Bacillus thuringiensis Cry toxins in mammals. *J Appl Toxicol*, 36(5), 630-648. doi:10.1002/jat.3252
- Rubio-Infante, N., Ilhuicatzí-Alvarado, D., Torres-Martínez, M.,. (2018). The macrophage activation induced by Bacillus Cry1Ac protoxin involves ERK1/2 and p38 pathways and the interaction with cell-surface-HSP70. *Journal of cellular biochemistry*(119), 580-598.
- S. Rojas-Hernández, M. R.-M., R. López-Revilla , Aa Reséndiz-Albor , L. Moreno-Fierros. (2004). La coadministración intranasal de la protoxina Cry1Ac con lisados de amebas aumenta la protección contra la meningoencefalitis por Naegleria fowleri. *Infectar. Immun.*, 4368 - 4375.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J*, 9(3), 283-300. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x
- Santos-Vigil, K. I., Ilhuicatzí-Alvarado, D., García-Hernández, A. L., Herrera-García, J. S., & Moreno-Fierros, L. (2018). Study of the allergenic potential of Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin following intra-gastric administration in a murine model of food-allergy. *Int Immunopharmacol*, 61, 185-196. doi:10.1016/j.intimp.2018.05.029
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. (1998). Bacillus thuringiensis and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol.*, 62: 775-806.
- Servin-Garrido, R.-R., Ilhuicatzí-Alvarado, D., Jiménez-Chávez, A.-J. & Moreno-Fierros, L. (2022). Cry1Ac Protoxin Confers Antitumor Adjuvant Effect in a Triple-Negative Breast Cancer Mouse Model by Improving Tumor Immunity. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 5-12.
- Siegel, J. P. (2001). The mammalian safety of Bacillus thuringiensis-based insecticides. *J Invertebr Pathol*, 77(1), 13-21. doi:10.1006/jipa.2000.5000
- Snell, C., Bernheim, A., Bergé, J. B., Kuntz, M., Pascal, G., Paris, A., & Ricroch, A. E. (2012). Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: a literature review. *Food Chem Toxicol*, 50(3-4), 1134-1148. doi:10.1016/j.fct.2011.11.048
- Tome, J., Kamboj, A. K., & Pardi, D. S. (2021). Microscopic Colitis: A Concise Review for Clinicians. *Mayo Clin Proc*, 96(5), 1302-1308. doi:10.1016/j.mayocp.2021.03.022
- Torres-Martínez, M., Rubio-Infante, N., García-Hernández, A. L., Nava-Acosta, R., Ilhuicatzí-Alvarado, D., & Moreno-Fierros, L. (2016). Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 78, 106-115. doi:10.1016/j.biocel.2016.06.022
- Torres-Martínez, M., Rubio-Infante, N., García-Hernández, A. L., Nava-Acosta, R., Ilhuicatzí-Alvarado, D., & Moreno-Fierros, L. (2016). Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38. *The international journal of biochemistry*(78), 106-115.
- Vázquez-Padrón, R. I., González-Cabrera, J., García-Tovar, C., Neri-Bazan, L., López-Revilla, R., Hernández, M., . . . de la Riva, G. A. (2000). Cry1Ac protoxin from Bacillus thuringiensis sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem Biophys Res Commun*, 271(1), 54-58. doi:10.1006/bbrc.2000.2584
- Whiteley, H. R., & Schnepf, H. E. (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in Bacillus thuringiensis. *Annu Rev Microbiol*, 40, 549-576. doi:10.1146/annurev.mi.40.100186.003001
- Xiong, Y., Xu, G., Chen, M., & Ma, H. (2022). Intestinal Uptake and Tolerance to Food Antigens. *Front Immunol*, 13, 906122. doi:10.3389/fimmu.2022.906122
- Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z., & Sun, M. (2014). Structural insights into Bacillus thuringiensis Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins (Basel)*, 6(9), 2732-2770. doi:10.3390/toxins6092732
- Zeljenková, D., Ambrušová, K., Bartušová, M., Kebis, A., Kovřížnych, J., Krivošíková, Z., . . . Spustová, V. J. A. o. t. (2014). Ninety-day oral toxicity studies on two genetically modified maize MON810 varieties in Wistar Han RCC rats (EU 7th Framework Programme project GRACE). 88, 2289-2314.

Zhou, Z., Dai, C., & Liu, W. X. (2015). Anti-TNF- α therapy about infliximab and adalimumab for the effectiveness in ulcerative colitis compared with conventional therapy: a meta-analysis. *Hepatogastroenterology*, 62(138), 309-318.