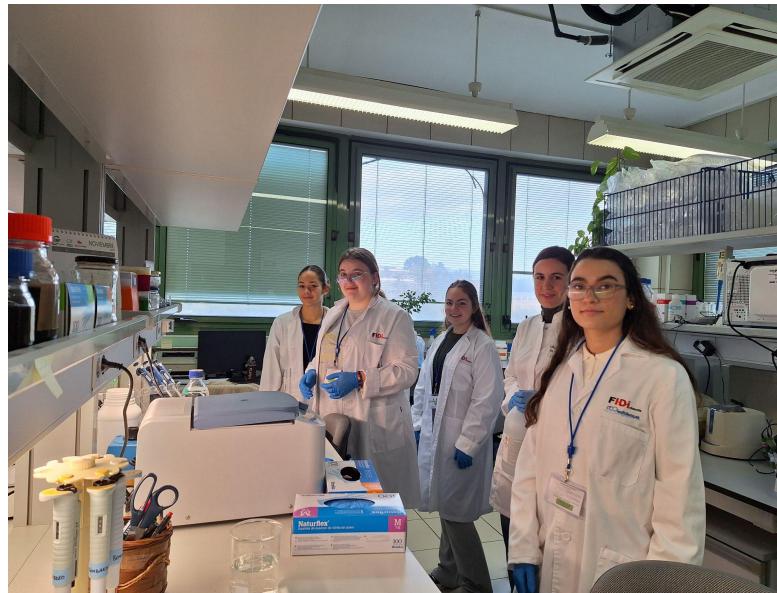

IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LÍNEAS DE TRIGO SIN GLUTEN HIPOALERGÉNICAS PRODUCIDAS POR CRISPR/CAS Y ARNi



ALUMNADO:

Rosa Gálvez García (1º Bach, IES Fidiana (Córdoba))
Miriam Serrano Quesada (1º Bach, IES Fidiana (Córdoba))
Ainoa Medrano Baena (1º Bach, IES Fidiana (Córdoba))

PROFESORA COORDINADORA:

Dra Elena León Rodríguez (IES Fidiana de Córdoba)

INVESTIGADORES:

Dr Francisco Barro Losada (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC)
Dra Helena Guzmán López (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC)
Dra Miriam (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC)
Dra Marta Gavilán Camacho (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC)

FIDIciencia



Junta de Andalucía



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE
AGRICULTURA
SOSTENIBLE

IAS

ÍNDICE

ABSTRACT.....	3
1.- INTRODUCCIÓN.....	4
2.- OBJETIVOS	4
3.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	4
3.1. CRISPR/Cas	5
3.2. RNA de Interferencia (RNAi)	5
3.3. CRISPR x RNAi: Combinación de ambas tecnologías.....	5
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
4.1.- Variables de estudio	5
4.2.- Diseño del material experimental y/o de los instrumentos de recogida de información	5
4.3.- Diseño del trabajo de laboratorio.....	7
1 – Procesado de harina y muestras.....	7
2 – Extracción de gliadinas.....	8
3 – Preparación para RP-HPLC.....	8
4 – RP-HPLC	8
5 – Análisis de resultados	8
4.4.-Planificación de la investigación.....	9
5.- RESULTADOS.....	9
6.-DISCUSIÓN	13
7.-CONCLUSIONES	13
8.- AGRADECIMIENTOS.....	13
9.- BIBLIOGRAFÍA	14

ABSTRACT

IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LÍNEAS DE TRIGO HIPOALERGÉNICAS PRODUCIDAS POR CRISPR/CAS y ARNi

Gálvez-García, R.¹, Medrano Baena, A.¹, Pineda Jiménez, M.P.¹, Serrano Quesada, M.¹

Profesora coordinadora: Elena León Rodríguez¹

Investigadores: Barro Losada, F.², Gavilán Camacho, M.², Marín Sanz, M.², Guzmán López, H.²

¹ IES Fidiana C/Saturno s/n (C.P. 14014)

² Instituto de Agricultura Sostenible IAS-CSIC

En el Instituto de Agricultura Sostenible (IAS) se ha llevado a cabo una investigación científica en la que se han identificado y seleccionado líneas de trigo hipoalergénico sin gluten. Primero se preparó el material para comenzar dicha investigación (se tomaron 500-600 mg de granos de cada línea de trigo en tubos de 2mL), posteriormente se utilizó un molino de bolas para moler las muestras y después se tararon en una báscula de precisión. A continuación, se extrajeron las **gliadinas** preparando un tampón de extracción B1 (compuesto de etanol puro disuelto en H₂O) y se utilizó el molino para mezclar correctamente la muestra con el tampón B1 y centrifugar para poder obtener las gliadinas. A continuación, se utilizó un **HPLC en fase reversa (RP-HPLC)** para separar las fracciones de gliadinas y cuantificar los resultados de la investigación. Para ello se filtraron las muestras de gliadinas previa a la inyección en el HPLC. Las líneas de trigo que presentaron menor cantidad de cada una de las fracciones de proteína (**gamma-, omega- y alpha-gliadinas**) fueron las que habían sido obtenidas con las tecnologías CRISPR x RNAi y después CRISPR. Por tanto, la mejor tecnología para producir las líneas de trigo hipoalergénicas es la combinación de **CRISPR x RNAi**.

Palabras clave: RP-HPLC, CRISPR, CRISPR x RNAi, gamma-, omega- y alpha-gliadinas

A scientific investigation has been carried out at the Institute of Sustainable Agriculture (**IAS**), where gluten-free hypoallergenic wheat lines have been identified and selected. To obtain them, the students from IES Fidiana worked and followed these steps: first, wheat grains from the different lines were prepared to begin the research (500-600 mg of each line were prepared in 2mL tubes), then a **ball mill** was used to grind the samples, and afterwards, they were weighed using a precision scale. Next, gliadins were extracted by preparing an **extraction buffer B1** (pure ethanol dissolved in H₂O), and the mill was used again to mix properly the samples with the B1 buffer and centrifuge to obtain the gliadins. Then a reverse phase HPLC (RP-HPLC) was used to separate the gliadin fractions and quantify the results of the investigation. For this purpose, the gliadin samples were filtered prior to HPLC injection. The wheat lines that presented the lowest amount of each of the protein fractions (gamma-, omega- and alpha-gliadins) were those that had been obtained with CRISPR x RNAi and then CRISPR technologies. Therefore, the best technology to produce hypoallergenic wheat lines is the CRISPR x RNAi combination.

Keywords: RP-HPLC, CRISPR, CRISPR x RNAi, gamma-, omega- and alpha-gliadins

1.- INTRODUCCIÓN

El trigo es un cereal utilizado en una amplia variedad de productos alimenticios fundamentales en la alimentación de diversas culturas debido a sus propiedades nutritivas, su papel en la economía global y su contribución a la sostenibilidad agrícola. Uno de los componentes del trigo es el gluten, dentro de este se encuentran las gliadinas y las gluteninas que representan un 80-85% de las proteínas totales del grano de trigo. Aquellas que no forman parte del gluten representan el 15-20% y son proteínas estructurales y albuminas y globales, con un papel minoritario en la calidad harino-panadera de trigo.

La fracción de **gliadinas** es muy importante ya que es la principal fracción del gluten que es tóxica para personas con trastornos relacionados con el consumo de trigo. Las gliadinas se componen de omega-, alpha- y gamma-gliadinas que son las principales responsables de las reacciones inmunológicas por eso es muy importante eliminarlas o reducirlas del grano de trigo. Los procedimientos que se han utilizado en este trabajo han sido la tecnología CRISPR/Cas9, RNAi y CRISPR/Cas9 x RNAi.

CRISPR/Cas9 es una tecnología de edición genética basada en el sistema inmune adaptativo de bacterias. RNAi es un mecanismo celular de regulación génica que permite la eliminación de la expresión de genes específicos mediante la degradación del ARN mensajero. CRISPR x RNAi es una estrategia híbrida que combina la precisión de CRISPR con la regulación post-transcripcional del RNAi. Estas últimas líneas de trigo se han obtenido mediante el cruzamiento de las líneas CRISPR/Cas y las RNAi.

La cuestión científica que tratamos de resolver en este trabajo es ¿Qué tecnología, CRISPR/Cas9 o CRISPR x RNAi, es más efectiva en la creación de líneas de trigo hipoalergénicas con menor cantidad de gliadinas?

2.- OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar y comparar un conjunto de líneas RNAi y CRISPR/Cas y seleccionar aquellas líneas hipoalergénicas con menor contenido de gliadinas.

3.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El trigo es uno de los cultivos más consumidos a nivel mundial, siendo la base de una gran variedad de productos alimenticios. Este se compone de gluten y otros componentes.

El gluten es una proteína compleja que está formada principalmente por:

- **Gliadinas:** Proteínas monoméricas que contribuyen a la viscosidad de la masa y son las principales responsables de la toxicidad en personas con trastornos relacionados con el gluten. Las gliadinas se dividen en tres tipos principales: Omega-, Alpha- y Gamma-gliadinas.
- **Gluteninas:** Proteínas poliméricas que son las más importantes en determinar la calidad harino-panadera del trigo ya que forman una malla proteica que confiere a la masa las propiedades de elasticidad y extensibilidad.

Para desarrollar trigo hipoalergénico, se han implementado tecnologías avanzadas de modificación genética, entre ellas:

3.1. CRISPR/Cas

El sistema CRISPR/Cas es una tecnología de edición genética basada en el sistema inmunológico adaptativo de bacterias. Se utiliza para modificar o eliminar genes específicos de manera altamente precisa. Esta tecnología permite introducir mutaciones de forma precisa en regiones concretas del ADN, evitando la expresión de los genes asociados y por tanto la síntesis de las proteínas correspondientes.

3.2. RNA de Interferencia (RNAi)

El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo natural de regulación génica que permite la degradación selectiva del ARNm antes de que sea traducido en proteínas. Su fundamento reside en la formación de un ARN de doble cadena que es reconocido por un sistema muy preciso de regulación postranscripcional que identifica los ARN mensajeros asociados, permitiendo la degradación de los mismos y evita la síntesis de las proteínas asociadas.

Esto permite reducir la expresión de genes sin necesidad de modificar el ADN. Es un mecanismo reversible y disminuye la producción de gliadinas sin alterar el genoma. Sin embargo, para que el sistema sea efectivo en sucesivas generaciones es imposible introducir un transgen que codifica para el ARN de doble cadena.

3.3. CRISPR x RNAi: Combinación de ambas tecnologías

La estrategia CRISPR x RNAi combina la edición genética de CRISPR/Cas con la regulación post-transcripcional del RNAi. Esto permite un control más preciso sobre la expresión de los genes sin alterar permanentemente el ADN. Esta puede ser más eficiente que CRISPR o RNAi por separado.

La reducción de gliadinas mediante estas tecnologías podría tener un gran impacto en la industria alimentaria y en la salud pública, dado que permite el desarrollo de:

- Variedades de trigo hipoalergénico con menor contenido de gluten.
- Alimentos más seguros para personas con enfermedad celíaca o sensibilidad al gluten.
- Alternativas sostenibles para la producción de trigo sin afectar su rendimiento ni sus propiedades agronómicas.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

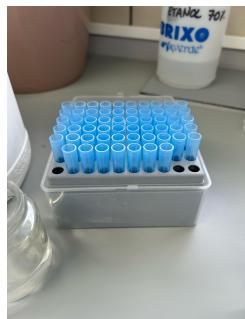
4.1.- Variables de estudio

En este proyecto de investigación vamos a utilizar dos tipos de variables.

- La variable independiente (que controlaremos), y es el tipo de tratamiento genético aplicado a cada línea.
- La variable dependiente es el tipo de **gliadinas** afectadas (α -, ω -, γ -gliadinas)

4.2.- Diseño del material experimental y/o de los instrumentos de recogida de información

Para la cuantificación de las fracciones de gliadinas hemos utilizado los siguientes materiales:



A



B



C

- **(A) Caja de puntas para micropipetas:** se usan para tomar y dispensar líquidos con precisión.
- **(B) Molino de bolas:** se utiliza para mezclar, triturar o homogeneizar muestras biológicas o químicas.
- **(C) Centrífuga de laboratorio:** se usa para preparar componentes de una muestra líquida aplicando fuerza centrífuga.



D

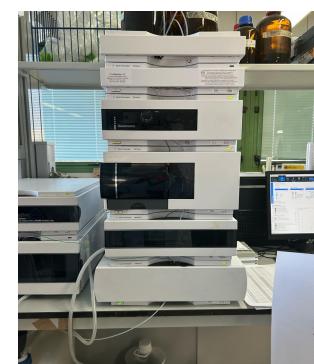


E



F

- **(D) Espátula de laboratorio:** tiene dos extremos uno en forma de pequeña cuchara o espátula cóncava (para recoger sustancias en polvo o granuladas) y otro extremo plano (para mezclar, triturar o manipular muestras). Se usa en laboratorios químicos, biológicos y farmacéuticos para manejar reactivos sólidos.
- **(E) Frasco con etanol:** se emplea en técnicas como HPLC y extracción en fase sólida.
- **(F) Báscula de precisión:** utilizada para medir masas con alta precisión, antes hay que tarar para garantizar medidas precisas.



G

H

I

- **(G) Cápsula de pesaje:** se utiliza en laboratorio para pesar pequeñas cantidades de sustancias sólidas, evitando la contaminación de la balanza y facilitando la transferencia de los materiales.
- **(H) Bloque individual metálico:** recipiente resistente a elevadas presiones para garantizar la adecuada fragmentación y mezcla de componentes en el molino de bolas.
- **(I) Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC):** se usa para la separación, identificación y cuantificación de diversos compuestos y proteínas, en nuestro caso de las gliadinas de trigo.



J



K

- **(J) Gradilla para microtubos:** soporte diseñado para mantener organizados y estables los microtubos utilizados en laboratorio.
- **(K) Micropipeta:** instrumento de laboratorio para medir y transferir volúmenes pequeños de líquido con gran precisión.

4.3.- Diseño del trabajo de laboratorio

1 – Procesado de harina y muestras

1. Etiquetado de tubos de 2mL con los nombres de las líneas de trigo a analizar; 1 tubo/muestra.
2. Se pesaron 500-600mg granos de cada línea fr trigo en dichos tubos de 2mL.
3. Se molieron los granos en el molino de bolas para obtener harina, para ello se utilizaron bloques individuales metálicos y bolas de acero grandes (Amp 30, 1 min). La harina resultante debe tener un aspecto uniforme; si no es así, repetir este paso.
4. Con la ayuda de una espátula, se traspasó la harina de cada muestra a su tubo de 2mL (previamente etiquetado en el paso 1).
5. Se limpiaron bien los bloques y las espátulas entre muestras para evitar contaminaciones:
 1. Agua y jabón
 2. Etanol al 70%
 3. Agua
 4. Secar
6. Se repitió el proceso hasta moler todas las muestras.
7. A continuación, se etiquetaron los tubos para la extracción de gliadinas: 4 repeticiones/muestra.
8. Finalmente se tararon los tubos en la báscula de precisión y se pesaron 50 mg de muestra (harina) en cada uno de ellos, y se añadió una bola de acero inoxidable de 5 mm a cada tubo.

2 – Extracción de gliadinas

1. Preparación del tampón de extracción B1: 60% etanol absoluto en H₂O Milli-Q (v/v). Cada muestra va a requerir 2mL de tampón para ser extraída.
2. Se añadieron 335 µL de B1 a cada tubo con 50 mg de harina y se cierra el tubo inmediatamente después, ya que el tampón B1 se evapora con facilidad.
Nota: No dejar el recipiente con B1 abierto más de lo necesario.
3. A continuación, se agitaron en el molino de bolas a una amplitud máxima (Amp 30) hasta conseguir mezclar bien la harina con el tampón (aprox. durante 30 segundos). Transcurrido ese tiempo reducir la frecuencia al mínimo (Amp 3) y mantener los tubos en agitación durante 10 min.
4. Centrifugación durante 15 min a 6000 x g a temperatura ambiente (RT).
5. Recuperación del sobrenadante sin perturbar el pellet y repetir 2 veces más los 3 pasos (los tres sobrenadantes se mezclan en un único tubo). Volumen final de extracción: ~1mL.
6. Se sellaron los tubos con Parafilm para evitar la evaporación.
7. Las muestras se guardan a -20°C.

3 – Preparación para RP-HPLC

1. Rotulación de los tubos con columnas de filtrado y viales de HPLC.
2. A continuación, se filtraron 750 µL de la fracción de gliadinas obtenida a través de las columnas de filtración, que contienen un filtro de 0.45 µm de diámetro de poro. Posteriormente se centrifuga durante 3 min a 6000 x g a RT. Si la muestra no se ha filtrado bien, se repite la centrifugación a mayor velocidad: 10000 x g.
3. Posteriormente se transfiere la fracción de gliadinas filtrada a viales de HPLC (simplemente volcando los tubos en los viales), y se cierra el vial inmediatamente después, no dejar viales abiertos más de lo necesario.

4 – RP-HPLC

1. En primer lugar, se preparó el HPLC rellenando las botellas de la fase móvil: A – Agua + 0.1% TFA y B – Acetonitrilo (ACN) + 0.1% TFA. *Paso realizado previamente por personal autorizado*
2. A continuación, se encendieron todos los componentes del HPLC (modelo 1200 de Agilent con un detector DAD UV-V de 210 nm), y se abren las válvulas para purgar el sistema.
3. Se ejecuta la aplicación 'HPLC online' en el ordenador.
4. Se cambia el flujo a 1mL/min al 100% de ACN para limpiar la columna. Dejar correr hasta que no se genere señal, y se cierra la válvula.
5. A continuación, se programa la 'Sequence table' con las muestras a correr, métodos y volúmenes de inyección correspondientes.
6. Si la presión está estable: presionar *Start*.

5 – Análisis de resultados

1. En primer lugar, se comprobó en el HPLC que las repeticiones de las muestras tienen la misma señal en el cromatograma resultante.
2. A continuación, se integraron los cromatogramas de las muestras con el mismo método de integración.

3. Se extrajeron los datos brutos de la integración de las muestras, así como de las señales.
4. A partir de las integraciones, se calculó la cantidad de gliadinas que tiene cada muestra mediante la comparación con una muestra de proteína control (BSA) previamente inyectada en el HPLC.
5. Se analizaron las diferencias en la cantidad de gliadinas entre muestras.
6. A continuación, se procedió a la elaboración de las tablas y figuras.
7. Finalmente se procedió a la elaboración del póster final.

4.4.-Planificación de la investigación

La investigación fue realizada en cuatro sesiones presenciales en el Instituto de Agricultura Sostenible en Córdoba y sesiones on-line para la elaboración de los documentos.

- **Primera Sesión, Fecha 5/11/2024.** En esta sesión se explicaron los fundamentos y se definió el objetivo final del proyecto: buscar las diferencias en líneas de trigo CRISPR/Cas y seleccionar líneas hipoalergénicas.
- **Segunda Sesión, Fecha 3/12/2024.** El objetivo de esta sesión fue el procesado de la harina y preparación de las muestras. Se etiquetaron tubos de 2 mL con los nombres de las líneas a analizar y se pesaron 500-600 mg de grano en cada tubo. Los granos se molieron en el molino de bolas (Amp 30, 1 min) hasta obtener una harina de aspecto uniforme, que se trasladó a los tubos correspondientes. Se limpian los materiales entre muestras para evitar contaminaciones. Luego, se etiquetaron tubos para la extracción de gliadinas, realizando cuatro repeticiones por muestra. Se pesaron 50 mg de harina en cada tubo y se añadió una bola de acero inoxidable.
- **Tercera Sesión, Fecha 15/01/2025.** El objetivo fue la extracción de las gliadinas. Para ello se preparó el tampón de extracción B1 (etanol absoluto en H₂O) y se añadieron 33 µL a cada tubo con 50 mg de harina, cerrándose de inmediato. Luego se agitaron en el molino de bolas (Amp 30) para mezclar bien y después a Amp 3 durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron 15 minutos a 6000 x g a temperatura ambiente, recuperando el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces más, obteniendo un volumen final de 1 mL. Finalmente, se sellaron los tubos con parafilm y se guardaron a -20 °C.
- **Cuarta Sesión, Fecha 18/02/2025.** El objetivo de esta sesión fue elaborar los datos y se procedió a la realización de las tablas, gráficas y póster final interpretando los datos.

5.- RESULTADOS

El objetivo del trabajo es comparar el efecto de diferentes modificaciones genéticas sobre la composición de las gliadinas, que están relacionadas con el gluten y pueden influir en propiedades nutricionales o alergénicas del trigo.

Se utilizó el **RP-HPLC**, que es una técnica de química analítica muy potente que se utiliza para separar compuestos en una mezcla de sustancias químicas o biológicas. Las muestras introducidas se prepararon filtrando la obtención de gliadinas a través de centrifugación y los diferentes pasos realizados. Con esta tecnología se obtuvieron los datos de la cantidad de proteína (**gamma, omega y alpha**) de todas las líneas de trigo producidas con cada una de las tecnologías CRISPR RNAi y CRISPR x RNAi. Las líneas de trigo que presentan menor cantidad de proteínas omega son AE900 y AE853, líneas obtenidas con la tecnología

CRISPR. Por su parte, las líneas que presentan mayor disminución de proteínas alpha-gliadinas son las L-004 y X477, una línea CRISPR x RNAi y una línea CRISPR, respectivamente.

Por su parte, la línea que presenta menor contenido de gamma-gliadinas es la L-004, una línea CRISPR x RNAi, que también presentó el menor contenido en alpha-gliadinas.

Teniendo en cuenta el total de gliadinas, la línea que presenta menor cantidad es la L-004, que es una línea CRISPR x RNAi.

Considerando todos los resultados, podemos concluir que la combinación de las tecnologías CRISPR y RNAi es la mejor para obtener una disminución más eficiente de las gliadinas en trigo.

La Tabla 1 muestra las distintas líneas de trigo modificadas genéticamente con CRISPR, RNAi o combinaciones de ambas, así como la fracción de gliadinas (proteínas del gluten) eliminadas (α , ω , γ). Las muestras wild-type no tienen alteraciones, mientras que las modificadas presentan reducciones específicas en ciertas gliadinas, lo que indica el impacto sobre la reducción del gluten en cada una de las líneas de trigo.

Tabla 1. Relación de líneas de trigo, tecnologías y fracción de gliadinas eliminadas.

Línea	Tecnología	Gliadinas eliminadas
AL892	CRISPR	α -gliadinas
AH790	CRISPR	ω , γ -gliadinas
AH789	CRISPR	ω , γ -gliadinas
L-203	CRISPRxCRISPR	α -gliadinas
T257	RNAi	α , ω , γ -gliadinas
L-003	RNAixCRISPR	α , ω , γ -gliadinas
BW208	wild-type	wild-type
AB343	CRISPR	α -gliadinas
AB344	CRISPR	α -gliadinas
X477	CRISPR	α -gliadinas
AL893	CRISPR	α -gliadinas
AH788	CRISPR	ω , γ -gliadinas
AH787	CRISPR	ω , γ -gliadinas
L-204	CRISPRxCRISPR	α -gliadinas
T258	RNAi	α , ω , γ -gliadinas
L-004	RNAixCRISPR	α , ω , γ -gliadinas
BW208	wild-type	wild-type

Por su parte, en la Figura 1 se muestran los cambios en cada una de las fracciones de gliadinas (omega, alfa y gamma) en diferentes líneas de trigo modificadas genéticamente. Los colores representan distintos plásmidos utilizados, y los valores negativos indican reducción. Algunas modificaciones afectan solo un tipo de gliadina, mientras que otras reducen varias simultáneamente.

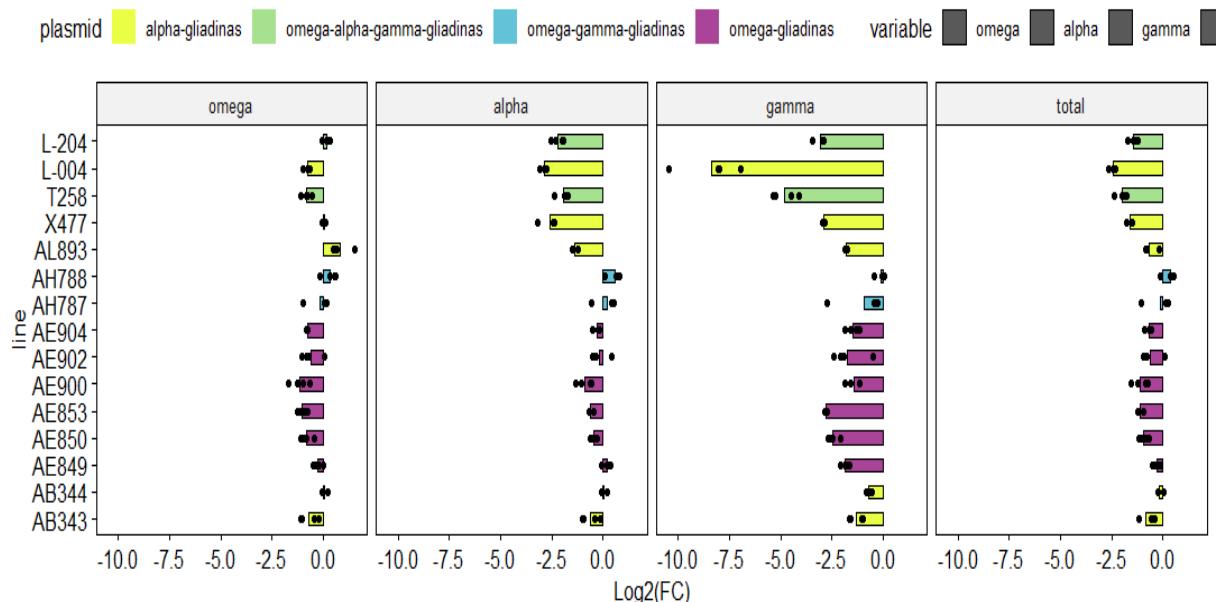


Figura 1. Reducción o incremento de las fracciones de gliadinas en las diferentes líneas de trigo analizadas en este trabajo.

Como se observa, la línea L-004 presenta una reducción muy significativa en el contenido en gamma-gliadinas y alpha-gliadinas. La línea T258 también presenta una reducción elevada en gamma y Alpha-gliadinas. Por su parte, la línea AL893 presenta una reducción muy pequeña en todas las fracciones de gliadinas.

Extractos proteicos de las variedades CRISPR se cargaron en geles A-PAGE (Figura 2). **Como se observa**, el gel de electroforesis muestra la expresión de gliadinas (ω , γ , α) en líneas de trigo modificadas con el plásmido pSSLOmega9. Las bandas indican la presencia de proteínas, y las diferencias con el control (WT) sugieren cambios en la expresión de gliadinas debido a la modificación genética.

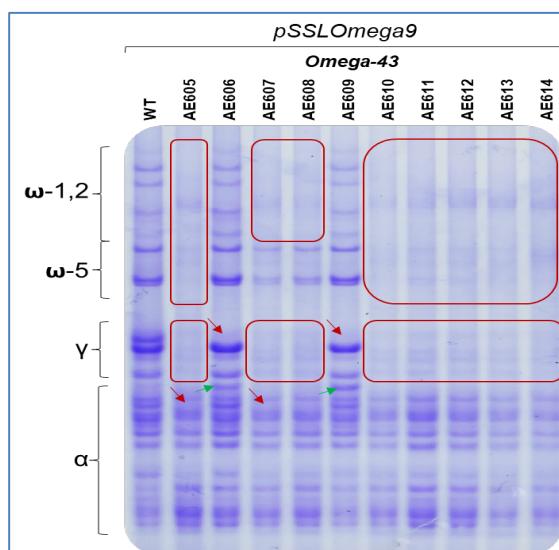


Figura 2. Fraccionamiento de gliadinas de trigo en líneas

La Tabla 2 muestra los datos para la cantidad de proteínas (en μg por mg de harina) en las líneas de trigo, incluyendo variedades silvestres (WT) y modificadas genéticamente mediante CRISPR y RNAi. Se analizan tres tipos de gliadinas (omega, alfa y gamma), y se describen los valores individuales y totales de estas proteínas en cada muestra. También se presentan estimaciones de error para cada medición.

Tabla 2. Contenido en las tres fracciones de gliadinas de cada una de las líneas de trigo obtenidas usando las tecnologías descritas. Los valores se indican en μg proteína / mg harina. Se indica también el error estándar asociado a las 4 mediciones

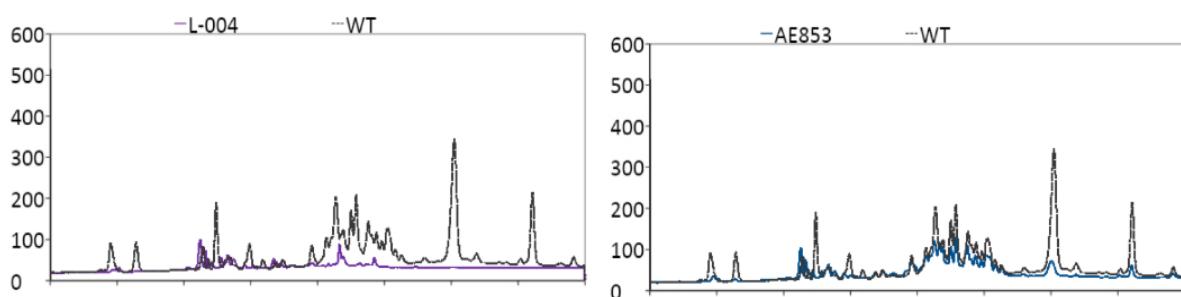
Tecnología	Gliadinas	Línea trigo	μg prot. / mg harina				Error Estandar			
			Omega	Alpha	Gamma	Total	Omega	Alpha	Gamma	Total
WT	NA	BW208	16,9	40,2	26,6	83,8	1,39	2,89	1,59	5,82
CRISPR	alpha-gliadinas	AB343	10,8	26,9	11,1	48,8	1,66	3,90	1,38	6,87
CRISPR	alpha-gliadinas	AB344	17,4	40,8	16,4	74,5	0,89	1,84	0,78	3,39
CRISPR	omega-gliadinas	AE849	14,2	46,8	7,4	68,4	1,05	2,98	0,44	4,22
CRISPR	omega-gliadinas	AE850	9,8	29,7	4,9	44,4	1,04	1,51	0,46	2,87
CRISPR	omega-gliadinas	AE853	8,4	25,9	3,8	38,1	0,66	0,91	0,09	1,53
CRISPR	omega-gliadinas	AE900	7,9	22,1	10,2	40,2	1,13	2,77	1,19	5,04
CRISPR	omega-gliadinas	AE902	9,5	30,2	6,1	56,8	0,61	0,91	0,61	11,09
CRISPR	omega-gliadinas	AE904	9,9	32,4	9,8	52,1	0,10	1,54	1,03	2,49
CRISPR	omega y gamma-gliadinas	AH787	18,2	55,6	20,9	81,0	0,60	1,37	0,73	13,84
CRISPR	omega y gamma-gliadinas	AH788	23,9	67,2	27,1	108,0	1,35	2,01	0,91	10,54
CRISPR	alpha-gliadinas	AL893	25,1	14,6	7,8	54,1	0,88	0,13	0,24	6,68
CRISPR	alpha-gliadinas	K477	17,5	6,8	3,6	27,8	0,42	0,78	0,07	1,14
RNAi	alpha-, gamma- y omega-gliadinas	T258	9,7	10,6	1,0	21,3	0,81	0,99	0,22	1,82
RNAi x CRISPR	alpha-, gamma- y omega-gliadinas	L-004	9,9	5,5	0,1	15,5	0,48	0,27	0,04	0,77
CRISPR x CRISPR	alpha-gliadinas	L-204	19,2	8,9	3,2	31,3	1,20	0,84	0,26	2,26

En la Figura 3 se muestran los perfiles de espectrometría de masas o cromatografía de proteínas para comparar la composición de gliadinas en diferentes muestras de trigo.

- En la primera gráfica, se comparan las muestras L-004 (modificada) y WT (silvestre).
- En la segunda gráfica, se comparan las muestras AE853 (modificada) y WT.

Las líneas negras corresponden a la muestra WT (trigo no modificado), mientras que las líneas de colores representan las muestras de proteínas correspondientes a las líneas modificadas. Se observan diferencias en la intensidad y presencia de ciertos picos, lo que sugiere variaciones en la cantidad o tipo de proteínas presentes debido a las modificaciones genéticas.

Figura 3. Cromatograma de las líneas de trigo L-004 (RNAi x CRISPR) y AE853 (CRISPR)



Tratamiento de los resultados

Los resultados expresan la media de cuatro replicas diferentes para cada una de las líneas. A partir de estos resultados se ha calculado el error estándar.

6.-DISCUSIÓN

En este trabajo hemos utilizado líneas de trigo generadas utilizando la tecnología RNAi (Barro et al., 2016) y CRISPR/Cas (Sánchez-León et al., 2018: 2024). En ambos trabajos se describe que ambas tecnologías son muy efectivas para eliminar las gliadinas de trigo y reducir el contenido en gluten.

En nuestro trabajo hemos identificado líneas de trigo con muy bajos contenido en gamma y Alpha-gliadinas (L004), que corresponde a una línea obtenida combinando ambas tecnologías.

Hay que tener en cuenta que algunas líneas, como la AL893 (CRISPR) presenta unos contenidos en omega-gliadinas mucho más elevados que la línea wild-type. Este fenómeno ya ha sido descrito con anterioridad en las líneas RNAi y CRISPR, donde se produce un efecto compensatorio regulado por una red de factores de transcripción que controlan la expresión de las proteínas del gluten a diversos niveles (Marín-Sanz et al., 2022).

Nuestro estudio, al contrario que los citados anteriormente, ha demostrado que una combinación de tecnologías como RNAi y CRISPR/Cas es mucho más efectiva que usando cada una de ellas por separado. Estas líneas se han obtenido mediante cruzamientos dirigidos, y presentaron el menor contenido en alpha-gliadinas y gamma-gliadinas.

7.-CONCLUSIONES

- En esta investigación se concluye que las líneas en las que encontramos menor cantidad de proteínas omega son: AE900 y AE853, que han obtenido con la tecnología CRISPR.
- Las líneas en las que encontraron mayor disminución de proteínas alpha-gliadinas son las L-004 y X477, obtenidas mediante la tecnología CRISPR x RNAi y la tecnología CRISPR, respectivamente.
- La línea donde observaron menor contenido de gamma-gliadinas es la L-004, obtenida mediante tecnología CRISPR x RNAi.
- Finalmente, se concluyó que la combinación de la tecnología CRISPR x RNAi es la mejor para disminuir el contenido de gliadinas en el trigo.

8.- AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar su más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que han hecho posible este proyecto.

En primer lugar, agradecen a los investigadores Francisco Barro Losada, María Elena Guzmán López, Marta Gavilán Camacho y Miriam Marín Sanz, por su invaluable contribución, dedicación y conocimiento, los cuales han sido fundamentales en el desarrollo de este trabajo.

A la profesora Elena León Rodríguez, del IES Fidiana, por su excelente coordinación del proyecto y su apoyo continuo en cada una de las fases del mismo.

Al Instituto de Agricultura Sostenible por acogernos en sus instalaciones y brindarnos su experiencia y recursos, contribuyendo significativamente al éxito del proyecto.

Este trabajo ha contado con el apoyo de los proyectos, financiados por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 (PID2022-142139OB-I00 y TED2021129733B-I00); Unión Europea («NextGenerationEU»/PRTR); Junta de Andalucía (QUAL21_023 IAS); y 'Conexión TRIGO' del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

A Fidiciencia 3.0, por continuar celebrando el Congreso Científico Internacional Eurociencia Joven y darnos la oportunidad de presentar nuestro trabajo.

Finalmente, queremos agradecer a todas aquellas personas e instituciones que han colaborado proporcionando material, ideas o su apoyo logístico en cualquier momento del proceso.

9.- BIBLIOGRAFÍA

MedlinePlus (2025). "Enfermedad celíaca". Bethesda, MD: MedlinePlus. Recuperado de <https://medlineplus.gov/spanish/celiacdisease.html>

Mayo Clinic (2025). "Enfermedad celíaca: Síntomas y causas". Rochester, MN: Mayo Clinic. Recuperado de <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/celiac-disease/symptoms-causes/syc-20-352220>

Barro, F., Lehisa, J. C. M., Giménez, M. J., García-Molina, M. D., Ozuna, C. V., Comino, I., et al. (2016). Targeting of prolamins by RNAi in bread wheat: effectiveness of seven silencing-fragment combinations for obtaining lines devoid of coeliac disease epitopes from highly immunogenic gliadins. *Plant Biotechnol J* 14, 986–996. doi: 10.1111/pbi.12455

Guzmán-López, M. H., Sánchez-León, S., Marín-Sanz, M., Comino, I., Segura, V., Vaquero, L., et al. (2021): "Oral Consumption of Bread from an RNAi Wheat Line with Strongly Silenced Gliadins Elicits No Immunogenic Response in a Pilot Study with Celiac Disease Patients", **Nutrients**, 13(4548), pp. 1-11. doi: 10.3390/nu13124548.

Liu, M., Huang, J., Ma, S., Yu, G., Liao, A., Pan, L., et al. (2023): "Allergenicity of Wheat Protein in Diet: Mechanisms, Modifications and Challenges", **Food Research International**, 112913. doi: 10.1016/j.foodres.2023.112913.

Marín-Sanz, M., and Barro, F. (2022). RNAi silencing of wheat gliadins alters the network of transcription factors that regulate the synthesis of seed storage proteins toward maintaining grain protein levels. *Front Plant Sci* 13, 935851. doi: 10.3389/fpls.2022.935851

Sánchez-León, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C. V., Giménez, M. J., Sousa, C., Voytas, D. F., et al. (2018): "Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9", **Plant Biotechnology Journal**, 16(902-910). doi: 10.1111/pbi.12837.

Sánchez-León, S., y Barro, F. (2021): "Biotechnological Strategies for the Treatment of Gluten Intolerance", en M. Rossi (ed.), **Biotechnological Strategies for the Treatment of Gluten*

Intolerance*, Londres, Academic Press, pp. 177–197. doi: 10.1016/b978-0-12-821594-4.00013-x.

Sánchez-León, S., Marín-Sanz, M., Guzmán-López, M. H., Gavilán-Camacho, M., Simón, E., and Barro, F. (2024). CRISPR/Cas9-mediated multiplex gene editing of gamma and omega gliadins: paving the way for gliadin-free wheat. *J. Exp. Bot.* 75, 7079–7095. doi: 10.1093/jxb/erae376