

# ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TECNICAS DE ARNi y CRSPR /Cas PARA LA ELIMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE TRIGO RESPONSABLES DE LA ENFERMEDAD CELÍACA



**CURSO 2021-2022**

**PROFESORA IES COORDINADORA:** *Dra Elena León Rodríguez*  
*IES Fidiana de Córdoba*

**INVESTIGADORES:** *Dr Francisco Barro Losada y Dra Helena Guzmán López*  
*Instituto de Agricultura Sostenible- CSIC de Córdoba*

## **ALUMNADO:**

Aitana Nieto Reus (1º BACH, IES Fidiana Córdoba)  
Natalia Rodríguez Escobar (1º BACH, IES Fidiana, Córdoba)  
Pablo Luque López (1º BACH, CES Lope de Vega Córdoba)  
Marcos Gómez Valverde (1º BACH, CES Lope de Vega, Córdoba)

**FID+ciencia**

**IES FIDIANA**

  
Cofinanciado por  
la Unión Europea

**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE  
AGRICULTURA  
SOSTENIBLE **IAS** 

# Índice

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>2.- OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>4</b>
a) Preparación de material .....	5
b) Extracción de gliadinas .....	5
c) Preparación de las muestras para RP-HPLC: .....	5
d) Inyección de las muestras en el RP-HPLC: .....	5
<b>4.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>6</b>
Tecnología ARNi .....	6
Tecnología CRISPR/cas .....	6
¿Qué es el gluten? .....	7
Patologías relacionadas con la ingesta de gluten .....	7
<b>5.- RESULTADOS</b> .....	<b>8</b>
<b>6.- CONCLUSIONES</b> .....	<b>11</b>
<b>7.- AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>11</b>
<b>8.- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>11</b>

# ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS DE ARNi y CRSPR /Cas PARA LA ELIMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE TRIGO RESPONSABLES DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

A. Nieto<sup>1\*</sup>, M. Gómez<sup>2\*</sup>, N. Rodríguez<sup>1\*</sup>, P. Luque<sup>2\*</sup>  
H. Guzmán<sup>3</sup>, F. Barro<sup>3</sup>, E. León<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IES Fidiana

<sup>2</sup> CES Lope de Vega

<sup>3</sup> Instituto de Agricultura Sostenible IAS-CSIC (Córdoba)

\*These authors contributed equally to this work

## ABSTRACT

El trigo es uno de los cereales más empleados en nuestra dieta, pero hay personas que no pueden tolerar un conjunto de proteínas que este contiene, el gluten. Para ello se investigan numerosas maneras de eliminar la fracción inmunogénica del gluten, que es la principal causante de la enfermedad celíaca, la gliadina, mediante distintas tecnologías. El principal objetivo de esta investigación es comparar dos métodos e identificar el más eficiente para eliminar las gliadinas de trigo, particularmente las  $\alpha$ -gliadinas, que son las más inmunogénicas. En esta investigación se han usado dos técnicas biotecnológicas: ARNi y CRISPR/Cas. Las semillas del trigo, ya tratadas con estas tecnologías, son molidas para obtener la harina, de donde se extraen las gliadinas con etanol y son analizadas en un HPLC de fase reversa (RP-HPLC), donde se separan los tres tipos de gliadinas ( $\alpha, \gamma, \omega$ ). Posteriormente se cuantifican las distintas fracciones de gliadinas utilizando BSA como patrón proteico control. Finalmente, los datos son tratados con software estadístico. Se observa que ambas técnicas son muy eficientes en la eliminación de las gliadinas de trigo. Sin embargo, la técnica con mayor eficacia para eliminar las gliadinas es el ARNi, ya que en las líneas de trigo obtenidas con esta técnica cantidad de gliadinas se reduce en un 97,3% mientras que en las líneas CRISPR se produce una reducción de un 73,2%. Hay que destacar que también se producen variaciones

en otros componentes del grano, como el almidón, presentando las líneas ARNi una cantidad mayor que en las líneas CRISPR.

**Palabras clave:** trigo, ARNi, CRISPR/Cas, gliadinas, celiacía

## 1.- INTRODUCCIÓN

El trigo es uno de los alimentos centrales de la dieta mediterránea, pero no todo el mundo puede tolerarlo. Las patologías relacionadas con el consumo de trigo se han incrementado en los últimos años. Podemos distinguir tres patologías: la enfermedad celíaca (enfermedad autoinmune que daña el intestino delgado y altera la absorción de las vitaminas, minerales y demás nutrientes que contienen los alimentos), las alergias al trigo (caracterizada por la producción de Inmunoglobulina E (IgE) ante proteínas que se encuentran en el trigo) y la sensibilidad al trigo no celíaca, con síntomas gastrointestinales y extraintestinales dependientes del gluten en pacientes no celíacos. El gluten de trigo es el principal responsable de estas patologías. El gluten está formado por dos grandes fracciones proteicas: gluteninas y gliadinas, siendo estas últimas, particularmente las  $\alpha$ -gliadinas, las principales responsables de la enfermedad celíaca. Hemos utilizado dos técnicas biotecnológicas para eliminar las gliadinas de trigo: el ARN de interferencia (ARNi) y CRISPR/Cas.

## 2.- OBJETIVOS

- Comparar la eficiencia de ambas tecnologías para la eliminación de las gliadinas del trigo.
- Identificar qué tecnología sería más beneficiosa en el mercado, tanto para el consumidor como para el proveedor y el agricultor.
- Cómo se ven afectadas el resto de las proteínas tras la eliminación de las gliadinas.

## 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

- Tubos de ensayo.
- Pipetas y puntas.
- Agitadores.
- Equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) modelo 1200 de Agilent) con un detector DADUV-V (210 mm).
- Máquina de centrifugado.
- Báscula electrónica de precisión analítica.

- Molino de bolas.
- EPIs necesarios: guantes, bata.
- Etanol 60% (B1).
- Reactivos para el HPLC

### **a) Preparación de material**

1. Moler grano en molino de bolas para obtener harina. Utilizar bloques individuales y bolas de acero grandes (Seleccionar Amp, 40 segundos).
2. Etiquetar tubos de 2 ml.
3. Tarar los tubos en la báscula de precisión y pesar 100 mg de muestra (harina). Añadir una bola de acero a cada tubo.
4. Comprobar si hay suficiente tampón B1 (2 ml/tubo). Si no, preparar tampón B1: etanol 60% para análisis en H<sub>2</sub>O Milli-Q (v/v).

### **b) Extracción de gliadinas**

1. Añadir 670 µl de B1 a cada tubo con 100 mg de harina. Agitar en molino de bolas a amplitud máxima (Amp 30) hasta mezclarlo todo bien (30s). Después, reducir la potencia al mínimo (Amp 3) y mantener en agitación por 10 min.
2. Centrifugar 15 min a 6000 x g a temperatura ambiente (RT).
3. Recuperar el sobrenadante sin perturbar el pellet y repetir 2 veces más los 3 pasos. Mezclar los tres sobrenadantes en un mismo tubo. Volumen final de extracción 2 ml.

### **c) Preparación de las muestras para RP-HPLC:**

1. Rotular los tubos.
2. Filtrar 800 µL de la fracción de gliadinas obtenidas a través de las columnas costar, que contienen un filtro de 0.45 µm de diámetro de poro. Filtrar mediante centrifugado durante 3min a 6000 x g a RT.
3. Transferir la fracción de gliadinas filtrada a viales de HPLC (volcando los tubos).
4. Colocar los viales en la bandeja de inyección.

### **d) Inyección de las muestras en el RP-HPLC:**

1. Encender todos los componentes del HPLC. Abrir válvula.
2. Abrir "Instrument online".
3. Cambiar el flujo a 1 ml/min al 100% de Aceto nitrilo (ACN) para limpiar la columna. Dejar correr hasta que no se genere señal. Cerrar válvula.
4. Introducir "Sequence table" con muestras a correr, seleccionar el método y los volúmenes de inyección correspondientes:
  - a. Método; "RP\_HPLC-Gli-Wei-S1"

- i. 0 min, 24% B (ACN 0.1%TFA)
  - ii. 60 min, 56% B
  - iii. 31-36 min 90% B
- b. Volumen de inyección; 20 µl
  - c. Flujo; 0.5 ml/min

5. Una vez que la presión sea estable: presionar start.

## 4.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### Tecnología ARNi

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo biológico, ampliamente distribuido en eucariotas, por el cual, se consigue silenciar genes, mediante moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc). Este mecanismo de silenciamiento de genes ha sido descubierto por los profesores Andrew Z. Fire (universidad de Stanford) y Craig C. Mello (universidad de Massachusetts), quienes han recibido el premio Nobel en Medicina por dicho descubrimiento.

El silenciamiento de genes se da en dos etapas; en la primera, el ARNdc es identificado por el complejo enzimático Dicer que fragmenta el ARNdc en pequeñas moléculas de 20-30 nucleótidos denominadas ARNsi, las cuales, sirven de molde para otro complejo enzimático, RISC, que actúan sobre el ARN mensajero (ARNm) endógeno, si las secuencias coinciden fragmenta los ARNm, impidiendo que sea traducido a proteína.

### Tecnología CRISPR/cas

El acrónimo CRISPR significa Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, y fue descubierto en bacterias que funcionan como un sistema inmune adaptativo. El sistema CRISPR está compuesto por un conjunto de secuencias repetidas espaciadas por otras secuencias no repetidas. Estas secuencias no repetidas son el material genético de los virus que han atacado a las bacterias en el pasado, por eso permiten reconocer si se repite la infección y defenderse ante ella cortando el ADN de los invasores. Los científicos han aprendido a utilizar la herramienta CRISPR fuera de las bacterias para cortar y pegar trozos de material genético en cualquier célula. El poder de estas tijeras moleculares es inmenso. Por eso, fue considerado el mayor avance científico del año 2015. El sistema CRISPR utiliza unas guías de ARN y una proteína (Cas9) para dirigirse a zonas elegidas del ADN y cortar. A partir de ahí, el sistema de reparación celular de ADN intenta pegar los extremos cortados, introduciendo pequeñas deleciones e

inactivando el gen. Por el contrario, si introducimos moldes de ADN, podemos reparar de forma precisa sin errores, lo que permite editar sus 'letras' a voluntad. Su función fue predicha por el microbiólogo ilicitano Francisco Mojica en el año 2005. Entre 2012 y 2013, los equipos de Jennifer Dounna, Emmanuelle Charpentier simplificaron el sistema y desarrollaron esta herramienta para modificar el ADN.

## ¿Qué es el gluten?

El gluten es un conjunto de proteínas que se encuentran en la semilla de muchos cereales como son el trigo, cebada, centeno, triticale, espelta, así como sus híbridos y derivados. Representa un 80 % de las proteínas del trigo y está compuesta por gliadinas y gluteninas. El grano de estos cereales no está compuesto únicamente por gluten, sino que existen otros componentes como son el almidón, el germen o el salvado, que si se extraen de manera cautelosa y con un control exhaustivo se podrían emplear como ingredientes en alimentos sin gluten.

El gluten se puede obtener a partir de la harina de trigo y otros cereales, lavando el almidón. Esta proteína es la responsable de la elasticidad de la masa de harina y confiere la consistencia y esponjosidad de los panes y masas horneadas. Es muy importante ya hace que el trigo se pueda panificar. Por este motivo es apreciado en alimentación, por su poder espesante.

## Patologías relacionadas con la ingesta de gluten

Hay varios tipos de patologías relacionadas con el trigo que podemos dividir en tres grupos:

### ***Enfermedad celíaca***

- *Es una enfermedad mediada por el sistema inmune.*
- La celiaquía es una enfermedad digestiva, consecuencia de la degradación incompleta del gluten de trigo, cuyos péptidos son tratados como antígenos por el sistema inmunitario, resultando en daños en el intestino delgado y altera la absorción de las vitaminas, minerales y demás nutrientes que contienen los alimentos. Hay diversas manifestaciones de esta enfermedad:
  - Ataxia por gluten: ataca al cerebelo y provoca descoordinación de movimientos.
  - Dermatitis herpetiforme: el sistema inmunitario ataca a algunas zonas de la piel creando ampollas.

### **Sensibilidad al gluten no celíaca**

- *Enfermedad mediada por inmunidad innata*

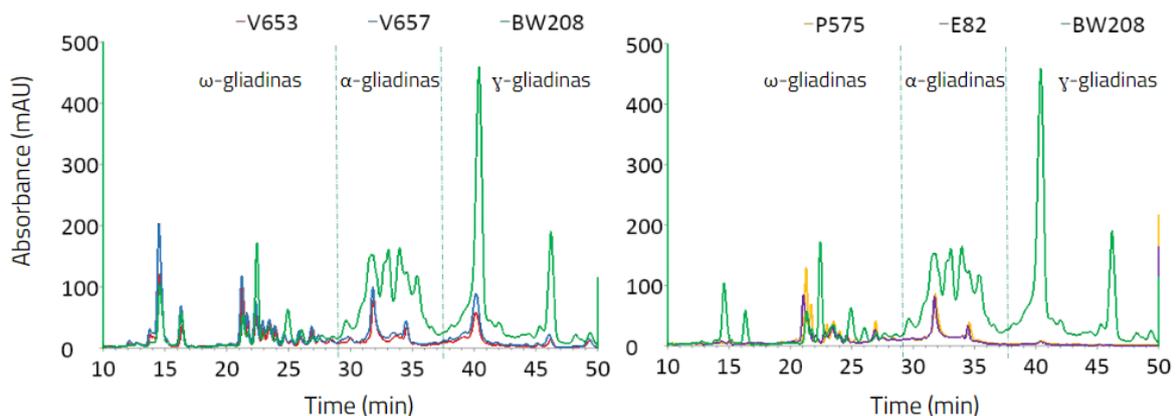
- Los síntomas son como los de las personas celíacas, pero estos pacientes no tienen alteraciones en el intestino delgado y no son celíacos. Los pacientes mejoran cuando no consumen trigo en su dieta.

### **Alergias al trigo**

- *Patologías mediadas por anticuerpos IgE.*
- Asma del panadero: es una de las alergias ocupacionales más comunes y el número de casos sigue aumentando. Los pacientes presentan diversos síntomas como son, entre otros: urticaria, dermatitis atópica, vómitos o problemas respiratorios.
- Anafilaxia al trigo dependiente de ejercicio físico: al consumir trigo en combinación con ejercicio físico los pacientes pueden desarrollar una anafilaxia general potencialmente mortal. La ingesta de trigo por sí sola no logra desencadenar los síntomas, se necesita practicar ejercicio.

## **5.- RESULTADOS**

En la Figura 1 se muestran los cromatogramas del extracto proteico de gliadinas en líneas CRISPR/Cas (izquierda) y ARNi (derecha). Las líneas verticales indican la separación de las fracciones de gliadinas. En estos dos cromatogramas se puede comprobar la eficacia de extracción de los extractos proteicos de las gliadinas de las líneas CRISPR/Cas y ARNi. Como se puede ver, hay grandes diferencias en los perfiles de gliadinas entre ambas líneas, sobre todo en la fracción de las gliadinas gamma y las gliadinas omega. Gracias a estos cromatogramas se puede apreciar que la técnica con mayor eficacia al eliminar las gliadinas es el ARNi.



*Figura 1. Cromatogramas del extracto proteico de gliadinas en líneas CRISPR/Cas (izquierda) y ARNi (derecha). Las líneas verticales indican la separación de las fracciones de gliadinas*

En la Figura 2 (box plot) podemos ver la comparación del contenido en almidón del grano de las líneas ARNi y CRISPR/Cas respecto al control. También podemos observar como el contenido en almidón del grano de las líneas ARNi es

considerablemente más alto que el almidón en las líneas CRISPR/Cas. La cantidad de almidón es importante ya influye en la elaboración de los alimentos, por lo que es una propiedad muy importante que se debe tener en cuenta cuando se quiere seleccionar la técnica para la eliminación de las gliadinas.

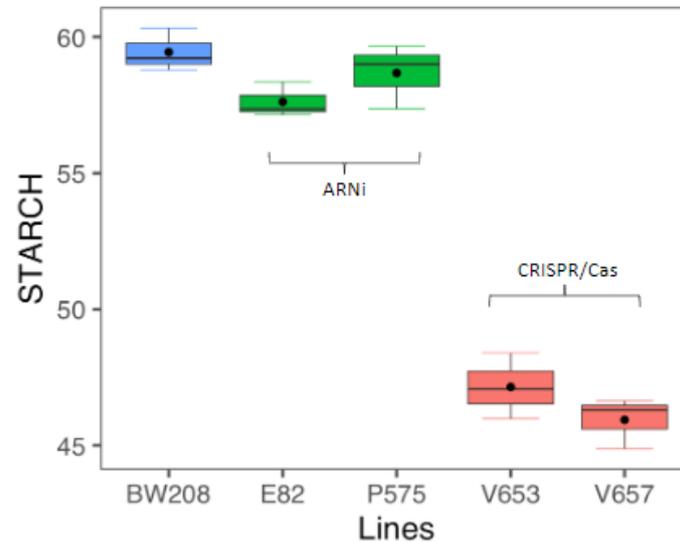


Figura 2. Contenido en almidón del grano de las líneas ARNi y CRISPR/Cas.

En la Figura 3 se muestra el contenido en gluten determinado por el anticuerpo monoclonal R5 y el contenido de proteína presente en el grano de las líneas RNAi y CRISPR. El contenido en gluten determinado por R5 presenta grandes diferencias entre las líneas CRISPR y las líneas ARNi. En las líneas ARNi, la cantidad de gluten se reduce en un 97,3% mientras que en las líneas CRISPR, se produce una reducción de solo un 73,2%. Por lo tanto, la técnica ARNi parece más eficaz para eliminar el gluten. Aunque se ha eliminado gran parte de las gliadinas, no existen diferencias significativas en la cantidad total de proteínas presente en el grano. Esto sugiere que existe una compensación con otro tipo de proteínas no pertenecientes al gluten como reacción al perder estas gliadinas.

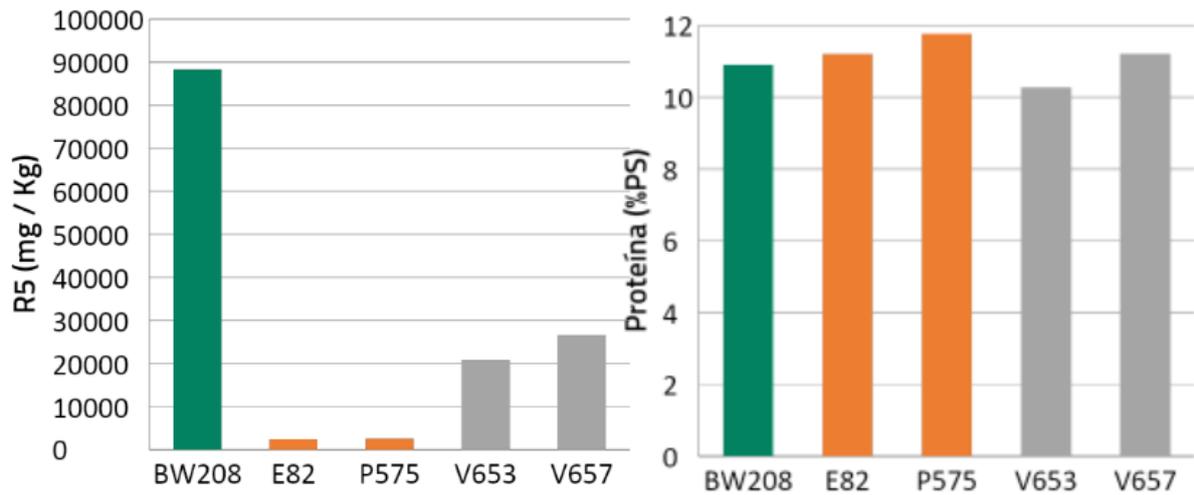


Figura 3. Contenido en gluten determinado por el anticuerpo monoclonal R5 (izquierda) y contenido total de proteína en el grano de las líneas estudiadas (derecha).

En la Figura 4 se presenta un mapa de calor donde se pueden ver las diferencias que existen entre todas las variables obtenidas en las líneas CRISPR y ARNi. Tras observar el mapa, podemos apreciar de que las líneas de ARNi son las más idóneas para nuestro objetivo, ya que además de reducir en mayor medida el contenido en gluten, otros parámetros importantes como el peso del grano no presenta una gran diferencia respecto al original y todas las fracciones de gliadinas desaparecen en un mayor porcentaje que en las líneas CRISPR.

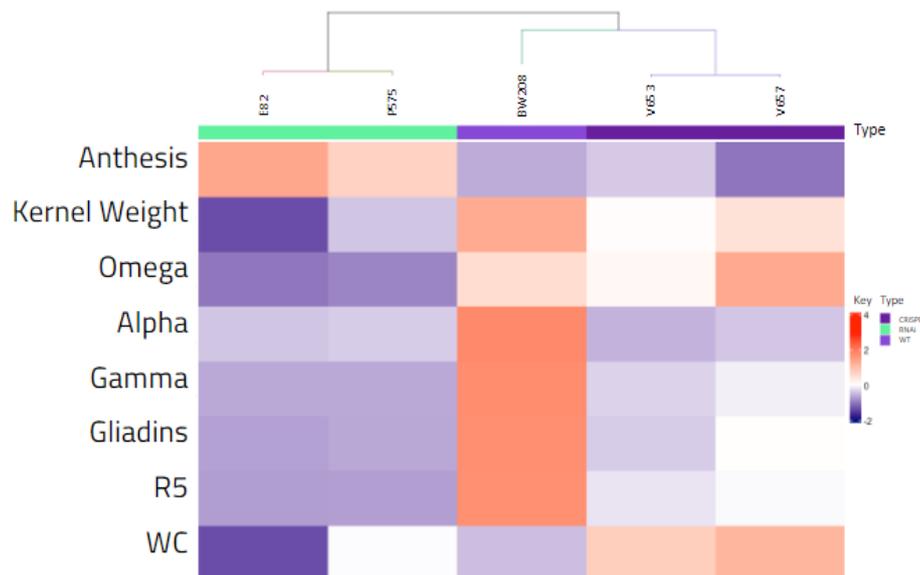


Figura 4. Mapa de calor de las variables estudiadas en este trabajo.

## 6.- CONCLUSIONES

1. Las líneas de ARNi presenta una mayor disminución de las proteínas relacionadas con las patologías del gluten, ya que hemos conseguido eliminar más porcentaje de gliadinas con esta técnica que con la de CRISPR/Cas
2. La tecnología ARNi tiene un efecto menor sobre otros componentes importantes del grano como el almidón y la proteína total, siendo estas cantidades mayor en las líneas ARNi que en las líneas CRISPR/Cas
3. Por lo tanto, el desarrollo de estas líneas supone un avance importante para la agricultura y la salud, que en un futuro no muy lejano ayudará a millones de personas con intolerancia al gluten, como los celíacos.

## 7.- AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a los investigadores Francisco Barro, María Elena Guzmán y Marta Gavilán, y a Elena León, tutora de este trabajo y coordinadora IES, así como a nuestros profesores Marcos y Elisa. También queremos agradecer al IES Fidiana, al IAS-CSIC, al CES Lope De Vega y a los proyectos Fidiciencia y Erasmus+ por otorgarnos la oportunidad de aprender acerca de cómo se desarrollan los trabajos de investigación. Por último, a nuestros queridos padres y familiares por brindarnos la mejor educación y apoyarnos en todo momento.

## 8.- BIBLIOGRAFÍA

- **Hüdig, M.; Laibach, N.; Hein, A.-C.** Genome Editing in Crop Plant Research—Alignment of Expectations and Current Developments. *Plants* 2022, 11, 212.
- **Giménez MJ, Gil-Humanes J, Alvarez JB, Barro F.** *Taxonomía de los cereales: el papel de la domesticación y la mejora genética en la intolerancia al gluten.* En Rodrigo L, Peña AS, Arranz E, Fernández-Bañares F, Rosell CM, editores. *Avances en el conocimiento de las patologías relacionadas con el gluten evolución de los alimentos sin gluten.* Sociedad Española de Enfermedad Celíaca; 2018. p. 441-470. ISBN:978-84-09-04161-9.
- **Barro, F., Gil-Humanes, J., & Piston, F. (2016).** Wheat allergies and intolerances and strategies to fight them. *The World Wheat Book: A History of*

Wheat Breeding, Volumen 3, (pp. 1345–1365). Publisher: Tec & Doc Lavoisier, 2016. ISBN 10: 2743020911/ ISBN 13: 9782743020910.