

**UTILIZACIÓN CONFINADA DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN / COMUNICACIÓN (1)**

Nº DE EXPEDIENTE

DATOS DEL SOLICITANTE / COMUNICANTE (1):

Nombre y apellidos o razón social del interesado (2): Dolores González Pacanowska

NIF: 22463712A Domicilio/Sede social: IPBLN-CSIC, Avda del Conocimiento 17, PTS, 18016 Armilla (Granada)

Nombre y Apellidos del Representante o Apoderado que presenta la solicitud o comunicación (2): Mario Delgado Mora

Domicilio que señala a efectos de notificaciones: Calle: Avda del Conocimiento 17, PTS Ciudad y Apartado Postal:
18016 Armilla (Granada)

Tel: 958181621 o 958181665 Fax: 958 181632 e-mail: mdelgado@ipb.csic.es

EXPONE: (3)

Que desea **solicitar una autorización** / ~~realizar una comunicación~~ (1)

de utilización confinada del (de los) organismo(s) modificado(s) genéticamente: *Trypanosoma cruzi* Tulahuen C2C4 strain

SOLICITA:

Que previos los trámites correspondientes, sea autorizada expresamente / se tenga por comunicada (1)

la UTILIZACIÓN CONFINADA DEL / DE LOS ORGANISMO(S) MODIFICADO(S) GENÉTICAMENTE antes señalada, en los términos establecidos en el Capítulo I del Título II de la ley 9/2003, de 25 de abril, que establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente; Real Decreto 178/2004 del 30 de enero por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente (modificado por el Real Decreto 367/2010, de 26 de marzo, de modificación de diversos reglamentos del área de medio ambiente para su adaptación a la Ley 17/2009, de 23 de noviembre, sobre el libre acceso a las actividades de servicios y su ejercicio, y a la Ley 25/2009, de 22 de diciembre, de modificación de diversas leyes para su adaptación a la Ley de libre acceso a actividades de servicios y su ejercicio).

DOCUMENTACIÓN QUE SE ACOMPAÑA (4)

(Detallar en Hoja 3):

Marque esta casilla si no autoriza a que la Administración Pública pueda recabar los documentos electrónicamente a través de sus redes corporativas o mediante consulta a las plataformas de intermediación de datos u otros sistemas electrónicos habilitados al efecto, debiendo acompañar en ese caso los correspondientes documentos.

Marque esta casilla si ha recibido financiación del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica

En Granada , 19 de Mayo de 2020

GONZALEZ
PACANOWSKA
DOLORES PETRA
22463712A

Firmado digitalmente por
GONZALEZ.PACANOWSKA
DOLORES PETRA - 22463712A
Fecha: 2020.05.26 19:31:21
+02'00'

Fdo: Dolores González Pacanowska

**Secretaría del Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente
DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIONES Y MERCADOS AGRARIO**

HECHOS, RAZONES DE LA SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN / COMUNICACIÓN (1)

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, hasta la fecha no hay ningún tratamiento profiláctico disponible y solo el violeta de genciana es usado con éxito en la prevención de la transmisión de la enfermedad vía transfusión sanguínea. Distintos fármacos, tales como derivados azólicos, nitroimidazoles y derivados púricos entre otros, presentan *in vitro* cierta actividad frente alguna forma del parásito. El nifurtimox (derivado nitrofurano) y el benzonidazol (derivado nitroimidazol), son los únicos fármacos disponibles en el mercado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Ambos nitroderivados dan lugar a serios efectos secundarios, por lo que su administración es desaconsejable, especialmente en los casos crónicos.

Por todo ello es necesario identificar nuevas cabezas de serie que permitan el desarrollo de nuevos fármacos frente a este organismo.

Los ensayos con el OMG solicitado (*Trypanosoma cruzi* Tulahuen C2C4 strain), están destinados a realizar cribados de compuestos, colecciones y quimiotecas frente a la forma intracelular de *Trypanosoma cruzi*, con el fin de evaluar su toxicidad sobre este organismo. El ensayo se realizará en placas multipocillo (96 y 384), formato que permite el cribado de un elevado número de compuestos frente al parásito cultivado *in vitro*.

La autorización para trabajar con este OMG, facilitaría la incorporación de este organismo a la plataforma del servicio científico, puesto en marcha en nuestro Centro (cuya responsable es Dra Dolores Gonzalez Pacanowska), de ensayo de colecciones de compuestos frente a parásitos protozoos, el cual permitirá al ensayo sobre las formas amastigotas intracelulares de *T.cruzi*, una mayor reproducibilidad y robustez de los ensayos y factores Z dentro de los límites 0,5-1. Este servicio ofrece prestaciones tanto al personal interno como personal externo de otros centros o del sector privado.

Debe señalarse si para la ejecución de esta actividad recibe financiación del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación. Esta información es necesaria para determinar si la actividad se encuentra dentro del supuesto del artículo 3.2.b) de la Ley 9/2003 y, por lo tanto, la competencia recae en la Administración General del Estado.

SI X NO

Si la respuesta a la pregunta anterior es **SI**, debe justificarlo especificando **(5)**:

-Nombre de la convocatoria: PN2016-Acción estratégica de salud-Redes temáticas inv. cooperativa (RETICS), 2016

-Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: RD16/0027/0014 “Red de investigación colaborativa en enfermedades tropicales” RICET; IP: Dolores González Pacanowska

-Organismo financiador: Instituto de Salud Carlos III

Las instalaciones y equipos ubicados en el IPBLN-CSIC están financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación y Universidades y cofinanciados por la Unión Europea, el Plan Estatal de investigación científica y técnica y de innovación y por el Instituto de Salud Carlos III

DOCUMENTACIÓN QUE SE ACOMPAÑA

- ❑ Información del Anexo III del Real Decreto 178/2004, incluida en los siguientes formularios elaborados por la Comisión Nacional de Bioseguridad. Se puede descargar de la [Web del Ministerio para la Transición Ecológica \(MITECO\)](#) y en la [sede electrónica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación \(MAPA\)](#).
 - **Formulario Parte A** relativo a la actividad con OMG.
 - **Formulario Parte B** relativo a la instalación en la que se va a trabajar con OMG. (No se envía puesto que ya fue enviado para una una notificación anterior para la Instalación con número A/ES/19/I-17)
 - **Formulario Parte C** relativo a la evaluación del riesgo de los OMG.
- ❑ Otra Documentación (indicar):
 - ❑ Anexo 1: Documentación sobre transporte (empresa, características y permisos)
 - ❑ Anexo 2: Publicación científica **Buckner FS et al. (1996)**. Efficient technique for screening drugs for activity against Trypanosoma cruzi using parasites expressing β -galactosidasa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40 (11): 2592-2597 relativa al procedimiento de la modificación genética.



**NOTIFICACIÓN SOBRE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: Insto. Parasitología y Biomedicina “Lopez-Neyra”. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (IPBLN-CSIC)
Dirección postal: Parque Tecnológico de la Salud.
Avda. del Conocimiento 17
18016 Armilla (Granada)

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Mario Delgado Mora
NIF: 08034904S
Cargo: Director
Tel: 958 181665, 958 181621
Fax: 958 181632
Correo electrónico: direccion.ipbln@csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Dolores González Pacanowska
NIF: 22463712A
Cargo: Investigador Principal y Responsable Servicio Científico IPBLN
Tel: 958 181631
Fax: 958 181632
Correo electrónico: dgonzalez@ipb.csic.es

d) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad

Nombre y apellidos: Salvador Jesús Guerrero Fernández
NIF: 77343256Y
Cargo: Responsable de Bioseguridad y Secretario del Comité de Bioética del IPBLN
Tel: 958 181621 (ext. 515)
Fax: 958 181632
Correo electrónico: segbiologica@ipb.csic.es

e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto:



Salvador Jesús Guerrero Fernández

- 2) Debe señalarse si para la ejecución de esta actividad se recibe financiación del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica. Esta información es necesaria para determinar si la actividad se encuentra dentro del supuesto del artículo 3.2.b) de la Ley 9/2003 y, por lo tanto, la competencia recae en la Administración General del Estado.

SI X NO

Si la respuesta a la pregunta anterior es **SI**, debe justificarlo especificando¹:

-Nombre de la convocatoria: PN2016-Acción estratégica de salud-Redes temáticas inv. cooperativa (RETICS), 2016

-Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: RD16/0027/0014 “Red de investigación colaborativa en enfermedades tropicales” RICET; IP: Dolores González Pacanowska

-Organismo financiador: Instituto de Salud Carlos III

Las instalaciones y equipos ubicados en el IPBLN-CSIC están financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación y Universidades y cofinanciados por la Unión Europea, el Plan Estatal de investigación científica y técnica y de innovación y por el Instituto de Salud Carlos III

Instalación donde se va a desarrollar la actividad de utilización confinada (*cumplimente si previamente ha sido comunicada/autorizada para este tipo de actividades; en caso contrario, cumplimente el Formulario Parte B*).

a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación: 20-02-19

b) Número de referencia del expediente: A/ES/19/I-17

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

- 1) Finalidad de la actividad:

Ensayo de compuestos, colecciones y quimiotecas frente a *Trypanosoma cruzi* para evaluar su citotoxicidad.

- 2) Clasificación de la actividad:

(Para la clasificación del tipo de riesgo de las operaciones se seguirá el procedimiento establecido conforme al artículo 4 y el anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos

¹TASAS

Están exentos del pago de la tasa los casos en los que se cumplan dos requisitos, que la actividad se realice en el marco de los Planes Estatales de Investigación Científica y Técnica y de Innovación; y que se desarrolle por una institución, ente u órgano público.



modificados genéticamente, y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las Notas de orientación para la evaluación del riesgo).

Tipo 1

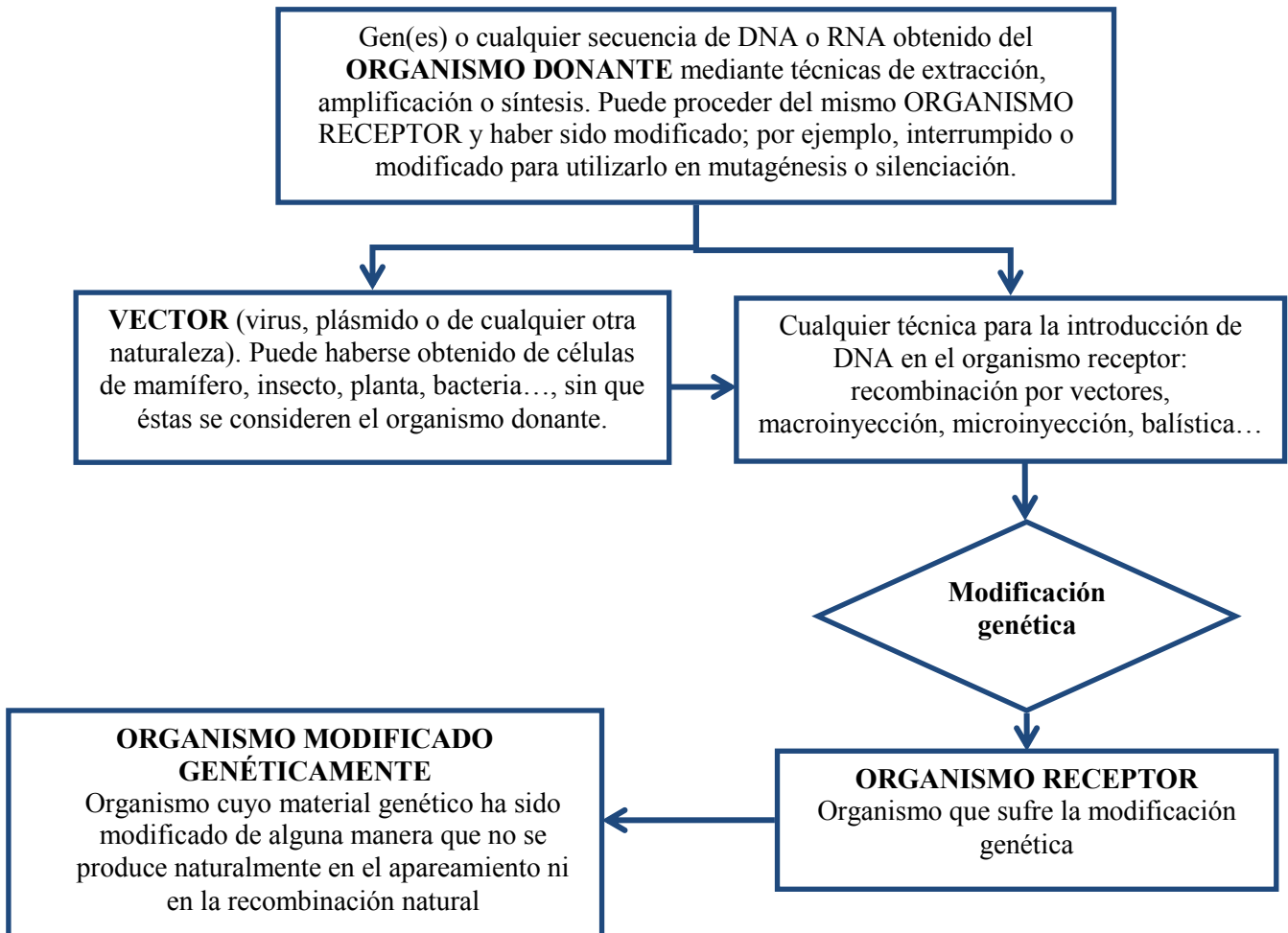
Tipo 2

Tipo 3 X

Tipo 4



PROCESO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE UN OMG A EFECTOS DE NOMENCLATURA:





III. INFORMACIÓN SOBRE EL ORGANISMO RECEPTOR DEL CUAL SE DERIVA EL OMG

1) Nombre científico: *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuen C2C4

Taxonomía: Reino: Protista; Subreino; Protozoa; Phylum: Sarcomastigophora; Clase: Zoomastigophora; Orden: Kinetoplastida; Familia: Trypanosomatidae; Genero: Trypanosoma; Especie: *cruzi*

Nombre común: *Trypanosoma cruzi*

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento: *T.cruzi* se puede aislar a partir de tejidos humanos (especialmente se encuentran en células cardíacas, músculos estriados sistema nervioso central y glándulas), utilizando medios de cultivo específicos para su mantenimiento “in vitro”

b) Técnicas de identificación: Examen microscópico, inmunofluorescencia (IFA, ELISA) y PCR

c) Marcadores genéticos: Marcadores de DNA microsatélite

d) Marcadores fenotípicos: *Trypanosoma cruzi* en su forma sanguínea, es una especie pequeña, con forma de C o de U y una longitud media de 20 μm . Su forma intracelular es redonda u ovalada con un diámetro de 1,5 a 4 μm

e) Estabilidad genética: Estable

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores: No

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI NO

5) En caso afirmativo, especificar para qué clase de los organismos (*seres humanos, animales, plantas*) se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos extracelulares:

Trypanosoma cruzi vivo es potencialmente patógeno para seres humanos y animales. En el caso de organismos muertos o sus productos extracelulares no son considerados patógenos.

6) Si el organismo receptor es patógeno para los seres humanos, especificar el grupo de riesgo asignado de acuerdo con la legislación comunitaria existente, (*en particular la Directiva 2000/54/CE*) o según otros sistemas de clasificación, nacionales o internacionales (*OMS, NIH, etc.*):

La clasificación en la CE es tipo 3 (Directiva 2000/54/CE)



La clasificación en USA según el NIH es tipo 2 (NIH_Appendix B-II-C. Risk Group 2 (RG2)-Parasitic Agents)

a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. La enfermedad se produce sobre todo en lactantes y niños en América del sur y central. En la naturaleza, los gatos, perros, murciélagos, roedores y otros mamíferos sirven como reservorios.

T. cruzi completa su ciclo biológico alternando en su ciclo de vida un huésped vertebrado (seres humanos y animales) y un insecto vector perteneciente especies de insectos reducidos presente en América latina.

Es muy importante destacar que *T. cruzi* no se transmite por vía aérea y necesita del vector para transmitirse de forma natural.

La fase aguda de la enfermedad manifiesta especialmente en los niños y se caracteriza por fiebre, adenitis, anemia y alteraciones nerviosas. A diferencia de otros tripanosomas *T. cruzi* nunca se divide en la sangre de los hospedadores mamíferos, estableciéndose especialmente en células cardíacas, músculos estriados, sistema nervioso central y glándulas, donde se dividen en forma intracelular y salen posteriormente a la sangre en forma tripomastigote cuando la célula del hospedador se rompe. Después de 2 a 4 meses la fase aguda de la enfermedad desaparece.

En caso de la fase crónica de la enfermedad los tripomastigotes no aparecen en la sangre, ya que los anticuerpos circulantes los matan rápidamente, sin embargo los parásitos son muy numerosos en las células de los tejidos, donde aparentemente están protegidos contra los anticuerpos. Para conseguir la supervivencia, los tripomastigotes que salen de las células rotas tienen que invadir inmediatamente otras para evadir la respuesta inmune del hospedador.

b) En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI NO

Porqué: No es el caso porque la cepa es virulenta

7) La cepa/línea celular receptora: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

Si

8) Experiencia adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor:

El trabajo con parásitos vivos se realiza siempre en cabinas de flujo de bioseguridad. Los tubos u otros contenedores que contengan parásitos vivos no pueden abrirse fuera de la cabina. Se deben utilizar doble guantes protectores y batas hidrófobas siempre que se manejen parásitos vivos. Si es necesario centrifugar, se utilizan tubos sellados. Es importante evitar todos los objetos que puedan ser punzantes (vidrio o metal).

9) Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente:



a) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?:

No

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

- i) esporas
- ii) endosporas
- iii) quistes
- iv) esclerocios
- v) esporas asexuales (hongos)
- vi) esporas sexuales (hongos)
- vii) otros, especifíquese

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

d) Posibles nichos ecológicos:

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

a) Implicaciones en procesos ambientales (*p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo*):

No posee

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Solo sobre insectos triatominos de America latina y a partir de mamíferos infectados en fase aguda.

11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:

Tanto el vector como el parásito está localizado en America del sur y central, principalmente en zonas rurales y viviendas con techumbre de paja

12) Hábitat natural del organismo:

En el hábitat selvático (salvaje), este organismo realiza el ciclo entre las especies silvestres y los insectos triatominos que habitan en ambientes selváticos. Los humanos y los animales



domésticos se infectan ocasionalmente cuando entran en contacto con estos insectos en el hábitat natural. En ciertas circunstancias, los insectos también pueden invadir los hogares o dependencias cuando son atraídos por la luz, el calor o determinados olores, y pueden contaminar los alimentos. Los insectos triatomínicos silvestres también pueden ser transportados accidentalmente a los hogares de los humanos.

También existe una transmisión doméstica en partes de Centroamérica y Sudamérica. En este ciclo, algunos insectos vectores han colonizado adobes primitivos, pastos y casas con techos de paja, lo que ocasionó la transmisión entre humanos e insectos. Los ciclos de transmisión entre insectos y animales domésticos (ciclos peridomésticos) también generan la oportunidad de que el parásito infecte a humanos.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: *Escherichia coli*

Taxonomía:

Nombre común: *E.coli*

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

La secuencia génica de ADN para el gen de la β -D-galactosidasa

3) Método de obtención:

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in Vitro*

4) Función del gen/genes en el organismo donante:

Expresión de la proteína codificada por el gen de la β -D-galactosidasa

5) ¿Es patógeno o nocivo de cualquier otra forma (*incluidos sus productos extracelulares*) el organismo donante, vivo o muerto?

SI NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

i) seres humanos

ii) animales



iii) plantas

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

El organismo donante no es patógeno

c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?

No, solo sirve para detectar los parásitos en los ensayos “in vitro”

6) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?

No

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

a) Inserción de material genético

b) Delección de material genético

c) Sustitución de bases

d) Fusión celular

e) Otros, especifíquese

2) Finalidad de la modificación genética:

Al incubar los parásitos transfectados con 100uM CPRG durante 16 hr a 37°C puede detectar la actividad de la β -D-galactosidasa en una densidad de parásitos hasta 2500 tripomastigotes por pocillo

3) Método utilizado para llevar a cabo la modificación genética:

La modificación genética se llevó a cabo por transfección. Para ello, se utilizó el plásmido de expresión (pBS:CL-Neo-01/BC-X-10) de *T.cruzi* construido con la incorporación de la región intergénica de la calmodulina-ubiquitina del locus 2,65 de la cepa CL. El plásmido fue construido con productos de PCR y clonaje múltiple en los sitios de restricción de pBluescibe. **Buckner FS et al (1996). Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidasa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (11): 2592-2597**



¿Se ha utilizado un vector en el proceso de modificación?

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

Plásmido pBluescibe (Stratagene, San Diego, CA)

b) Si se trata de un virus:

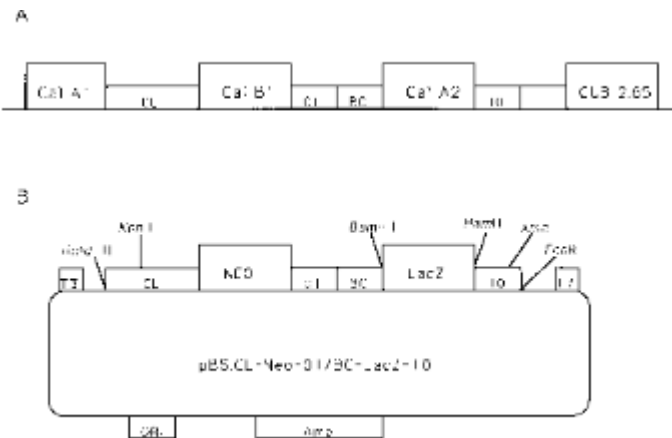
NO

Es defectivo en replicación SÍ NO

c) Aportar mapa de restricción del vector (*funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes en el vector*):

La figura A corresponde al mapa parcial del locus de la calmodulina (Cal)-ubiquitina del locus 2.65 de *Trypanosoma cruzi*.

La figura B es el plásmido de expresión pBS: CL-Neo-01/BC-LacZ-10



Buckner FS et al (1996). Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidasa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40 (11): 2592-2597

d) Gama de hospedadores del vector:

Bacterias

e) Características de la movilidad del vector: No posee



- i) factores de movilización
- ii) Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?
- iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?

No

4) Información del inserto:

- a) Dimensiones del inserto, mapa de restricción y secuencia:

Los sitios de restricción KpnI y XmnI flanquean la región que fue usada para preparar el fragmento de 5840 bp usadas en la electroporación de epimastigotes (forma peplativa del parásito en el insecto vector)

- b) Origen y función específica de cada parte del inserto:

El inserto del plasmido de expresión tiene la región intergenética de la calmodulina-ubiquitina de *T. cruzi* flanqueada por el gen de la neomicina fosfotransferasa (neo) y del gen de la β -galactosidasa (lacZ)

- c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Los epimastigotes fueron electroporados con 5 μ g de DNA, y seleccionados por crecimiento en G418(Gibco)

- d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto:

Ninguno

- e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:

Ninguno

- f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Si

- g) ¿Contiene secuencias que no son necesarias para la función deseada? En caso afirmativo, especifíquese.

No

- h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? No.



VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?

No

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?:

Si

En caso afirmativo:

i) número de copias: Una

ii) localización cromosómica: locus 2.65

iii) secuencias colindantes

gen calmodulina y gen de la ubiquitina

iv) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?: No

c) Si se trata de un virus: No se trata de virus

i) La inserción es específica

ii) La inserción se produce al azar

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas

d) Análisis moleculares realizados relativos a la expresión del producto deseado (*PCR, Northern, secuenciación, otros*):

iv) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación) X

v) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

vi) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas) X

Aportar toda la documentación al respecto.



Buckner FS et al. (1996). Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidasa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (11): 2592-2597 (Aportado como Anexo 2)

- 2) Características genéticas y fenotípicas modificadas del organismo receptor como resultado de la manipulación genética:
 - a) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo?: No
 - b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción?: No
 - c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales?: No
 - d) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente?: No
 - e) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales?: No
 - f) Marcadores específicos del OMG: neomicina fosfotransferasa (neo) y la β -galactosidasa (lacZ)
- 3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*): Es muy estable en cultivo en presencia de G418
- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos: Ninguna
- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
 - a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: Selección mediante G418, PCR y secuenciación
 - b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente: No se encuentra presente en el medio ambiente.

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

- 1) Naturaleza de las operaciones:
 - a) Enseñanza
 - b) Investigación
 - c) Desarrollo
- 2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:



- a) Volumen máximo en el caso de microorganismos: 5×10^5 parasitos por pocillo
 - b) Número de plantas:
 - c) Número de animales:
- 3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:
- El periodo previsto será de 6 años, principalmente en el proyecto colaborativo en el que participamos dentro de la RICET (Red de enfermedades Tropicales) financiado por el Insto. Salud Carlos III
- (Debe concretarse lo más posible la duración de la actividad por ejemplo, teniendo en consideración la duración de la financiación de los proyectos a los que están asociados las actividades con los OMG).*
- 4) Finalidad de la actividad de utilización confinada, incluidos los resultados esperados:
- Los ensayos están destinados a ensayar compuestos, colecciones y quimiotecas frente a *Trypanosoma cruzi* para evaluar su toxicidad. El ensayo se realizará en placas multipocillo (96 y 384), formato que permite el cribado de un elevado número de compuestos frente al parásito cultivado *in vitro*.
- La autorización para trabajar con este OMG, facilitaría la incorporación de este organismo a la plataforma del servicio científico, puesto en marcha en nuestro Centro (cuya responsable es Dolores Gonzalez-Pacanowska), de ensayo de colecciones de compuestos frente a parásitos protozoos, el cual permitirá al ensayo sobre las formas amastigotas intracelulares de *T.cruzi*, una mayor reproducibilidad y robustez de los ensayos y factores Z dentro de los límites 0,5-1 Este servicio ofrece prestaciones tanto al personal interno como personal externo de otros centros o del sector privado
- 5) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro centro o empresa (*señalar nombre y ubicación*), y si es así, si dicho centro o empresa está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG. En el caso de centros españoles, indicar el número de notificación si se conoce:
- Trypanosoma cruzi* Tulahuen C2C4 strain, containing LacZ gene UN 2814 de carácter infeccioso para humanos, procedentes del Swiss Tropical and Public Health Institute, Socinstrasse 57, 4002 Basilea, Suiza, fueron autorizadas por el Ministerio de Sanidad y Política Social, Subdirección General de Sanidad Exterior (mbiologicas@msp.es) su entrada en España procedente de Suiza el 19 de Enero de 2012 RG:257/RG 3830, para ser usadas en el cribado de quimiotecas y colecciones de productos con vista a la identificación de nuevos fármacos. Asimismo, se autorizó para su utilización para estudiar el modo de acción de fármacos.
- 6) Información sobre el transporte de los OMG en el caso de que provengan de, o se destinen a otros centros o instalaciones, así como descripción de las medidas adoptadas durante el mismo



en virtud de la legislación aplicable² (*tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado*):

La información solicitada se indica en el **Anexo 1**: Documentación sobre transporte (empresa, características y permisos)

- 7) Descripción de los métodos de manejo de los OMG (*incluyendo descripción de las fases de cultivo y concentración máxima de OMG en el cultivo*):

Los cultivos se realizarán en las cabinas de seguridad biológica tipo II que se hallan en la sala de cultivos NCB3 del IPBLN con número de notificación al MAPAMA A/ES/19/I-17, según procedimientos de trabajo descritos para ésta. La concentración esperada (densidad) de parásitos será hasta 2500 tripomastigotes por pocillo

- 8) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse:

El cultivo in vitro se llevará a cabo en el IPBLN. El IPBLN cuenta un laboratorio de seguridad nivel 3 (NCB3) y ha sido acreditado por la Dirección General de Relaciones Laborales y Seguridad y Salud Laboral de la Consejería de Empleo (Junta de Andalucía) para el uso de Agentes Biológicos de grupo 3 (RD 664/1997) con referencia de expediente N° 2016/GR/01. Las medidas aplicadas seguirán la normativa del Centro específicas en esta materia.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

- 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales: NO
- 2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:
- 3) Notificación de la instalación: indicar las secciones donde se desarrolla la actividad objeto de la notificación, con indicaciones de la categoría de confinamiento prevista: La actividad será desarrollada en el laboratorio de cultivos NCB3 del IPBLN

IX. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA

² Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- **(ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas)** del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera y principales modificaciones
- **Reglamento (CE) n° 1/2005** del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas y por el que se modifican las Directivas 64/432/CEE y 93/119/CE y el Reglamento (CE) n° 1255/97.
- **Reglamento (CE) n° 1946/2003** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente [Diario Oficial L 287 de 5.11.2003].
- **Artículo 18.2.c del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad**. Documentación acompañamiento en el movimiento transfronterizo: <https://bch.cbd.int/protocol/>



- 1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio: El trabajo en el área P3 se realiza conforme a las Buenas Prácticas de Laboratorio. Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso
- 2) Formación del personal adscrito: El responsable de laboratorio e investigador principal del proyecto, además de su larga experiencia en el trabajo con *Trypanosoma cruzi*, ha realizado el protocolo de autorización de acceso de usuarios al P3 en el IPBLN, que conlleva una formación en el uso y manipulación de organismos de riesgo biológico P3 y de protocolos de trabajo dentro de la instalación P3 del IPBLN. Protocolo que ha sido aprobado por el SPRL del CSIC y validado por la Consejería de Empleo, Empresa y Comercio (Junta de Andalucía) para aprobar el uso de la Instalación P3.
- 3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación: Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso
- 4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento: Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso
- 5) Programas de inspección y control del confinamiento: Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso

X. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

- 1) Encargado de la gestión de residuos:

- | | | | | |
|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|--------------------------|
| a) gestión interna: | SÍ | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| b) gestión por una empresa externa: | SÍ | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |

Si es el caso, nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:
STERICYCLE

- 2) Inactivación de residuos: método, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados:

RESIDUOS SÓLIDOS

El responsable interno del Servicio de Lavado y Esterilización del IPBLN se encargará de estas tareas:

Se quitarán las bolsas de autoclave y contenedores amarillos de desechos de las 2 cabinas, así como la bolsa de autoclave de la sala de trabajo y la bolsa de autoclave del transfer (contiene EPIS de desecho)

Éstos serán autoclavados posteriormente

Se colocarán nuevas bolsas y contenedores (añadiendo un poco de lejía a cada contenedor)



Se sacarán los residuos ya autoclavados por el sistema SAS (asegurarse que la luz UV incida en la mayor superficie posible de los mismos)

Tras ello, pasarán a ser retirados por la empresa externa Sterecycle que procederá a su gestión final.

RESIDUOS LÍQUIDOS

CONTENEDORES DE ASPIRACIÓN DE LÍQUIDOS

Descripción:

Están situados al lado de las Cabinas de Seguridad Biológica.

Tienen un recipiente de 2 l de capacidad, siendo autoclavable. Y está conectado a tubo de aspiración de silicona con cierre de seguridad para el seguro intercambio de la botella.

La botella se cambia cuando el líquido llegue al nivel de seguridad **o en cualquier caso una vez a la semana.**

Los residuos líquidos inactivados con Lejía, se verterán por la pila del sistema BIOWASTE evitando salpicaduras. Tras ello, la garrafa ya inertizada saldrá a través del SAS y su contenido se verterá en la depuradora general del Instituto.

XI. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES (Cumplimentar para los tipos 2, 3 y 4)

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Relacionadas con el cultivo del microorganismo, tales como generación de aerosoles, o casos de punción o corte. Muchos de estos supuestos están contemplados y la tendencia es minimizarlos, mediante el uso adecuado de EPIS, utilización de centrifugas con cestillos de seguridad así como de material de plástico que sustituya al vidrio como en pipetas Pasteur, pipetas, portaobjetos y cubreobjetos de plástico etc.

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese): Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores: Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso

4) Planes de emergencia: Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso



**EVALUACIÓN DE RIESGO DE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

- 1) Entidad
Nombre: Insto. Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (IPBLN-CSIC)
Dirección postal: Parque Tecnológico de la Salud. Avda. del Conocimiento 17
18016 Armilla (Granada)
- 2) Representante legal de la entidad
Nombre y apellidos: Mario Delgado Mora
NIF: 08034904S
Cargo: Director
Tel: 958181665, 958181621
Fax: 958181632
Correo electrónico: direccion.ipbln@csic.es
- 3) Responsable científico de la actividad
Nombre y apellidos: Dolores González Pacanowska
NIF: 22463712A
Cargo : Investigador Principal y Responsable Servicio Científico IPBLN
Tel: 958 181631
Fax: 958 181632
Correo electrónico: dgonzalez@ipb.csic.es
- 4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
Nombre y apellidos: Salvador Jesús Guerrero Fernández
NIF: 77343256Y
Cargo: Responsable de Bioseguridad y Secretario del Comité de Bioética del IPBLN
Tel: 958 181621 (ext. 515)
Fax: 958181632
Correo electrónico: segbiologica@ipb.csic.es
- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto

Salvador Jesús Guerrero Fernández

II.



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

(En el caso de que se notifiquen varias actividades de tipo 1, deberá rellenarse este apartado y adjuntar un cuadro resumen en que se recojan todas las actividades, según el modelo que figura en el anexo).

1) Objetivo de la actividad:

Ensayo de compuestos, colecciones y quimiotecas frente a *Trypanosoma cruzi* para evaluar su citotoxicidad.

2) Duración prevista de la actividad:

El periodo previsto será de 6 años, principalmente en el proyecto colaborativo en el que participamos dentro de la RICET (Red de enfermedades Tropicales) financiado por el Insto. Salud Carlos III

(Debe concretarse lo más posible la duración de la actividad (por ejemplo, teniendo en consideración la duración de la financiación de los proyectos a los que están asociados las actividades con los OMG).

III. EVALUACIÓN DE RIESGO

(Para llevar a cabo dicha evaluación se tendrá en cuenta el procedimiento establecido en el Anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo).

(En el caso de actividades de tipo 1 se incluirá en este apartado un listado de los principales organismos y material genético utilizados (organismos receptores, organismos donantes, insertos, vectores y organismos modificados genéticamente resultantes), así como la evaluación del riesgo para la salud humana y el medio ambiente de los mismos).

1) Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del:

(Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto).

a) Organismo receptor.

Trypanosoma cruzi cepa Tulahuen C2C4

b) Organismo donante.

Escherichia coli, no es patógeno por lo tanto no posee propiedades nocivas

c) Inserto.

El inserto del plasmido de expresión tiene la región intergenica de la calmodulina-ubiquitina de *T.cruzi* franqueada por el gen de la neomicina fosfotransferasa (neo) y del gen de la β -D-galactosidasa (lacZ)

d) Vector.



pBluescibe, no posee propiedades nocivas

- e) Organismo modificado genéticamente resultante.

Línea de laboratorio de *Trypanosoma cruzi* con una modificación genética llevada a cabo por transfección. Para ello, se utilizó el plasmido de expresión (pBS:CL-Neo-01/BC-X-10) de *T. cruzi* construido con la incorporación de la región intergénica de la calmodulina-ubiquitina del locus 2,65 de la cepa CL. Podrá así detectar la actividad de la β -D-galactosidasa.

- f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

Trypanosoma cruzi vivo es potencialmente patógeno para seres humanos y animales. En el caso de organismos muertos o sus productos extracelulares no son considerados patógenos. *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. La enfermedad se produce sobre todo en lactantes y niños en América del sur y central. En la naturaleza, los gatos, perros, murciélagos, roedores y otros mamíferos sirven como reservorios.

T. cruzi completa su ciclo biológico alternando en su ciclo de vida un huésped vertebrado (seres humanos y animales) y un insecto vector perteneciente a especies de insectos reduvidos presente en América latina.

Es muy importante destacar que *T. cruzi* no se transmite por vía aérea y necesita del vector para transmitirse de forma natural.

- g) Efectos para el medio ambiente.

No se prevén. Las líneas del parásito modificadas genéticamente no serán en ningún momento liberadas. Se mantendrán confinadas y su uso está restringido a experimentación en el laboratorio.

2) Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

(Para establecer esta primera valoración se tendrá en cuenta lo dispuesto en el artículo 4 de la Directiva 2009/41/CE y, en caso de ser aplicable, otros sistemas de clasificación nacionales e internacionales existentes, por ejemplo, la Directiva 2000/54/CE sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo).

- Tipo 1
- Tipo 2
- Tipo 3
- Tipo 4

3) Probabilidad de que se produzcan efectos nocivos y gravedad de los mismos, en función de: Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

- a) Características de la/s actividad/es (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental).



Las actividades se realizarán en instalaciones de bioseguridad de nivel 3 durante el cultivo en el IPBLN (BSL3),

- b) Concentración y escala utilizadas.

Densidad de parásitos de hasta 2500 tripomastigotes por pocillo

- c) Condiciones de cultivo (se tendrá en cuenta el entorno potencialmente expuesto, la presencia de especies susceptibles, supervivencia del OMG y efectos sobre el entorno físico).

Trabajo en habitación con confinamiento tipo 3, siempre en cabina de bioseguridad tipo II según las normas del IPBLN.

- 4) Determinación de la clasificación y medidas de confinamiento definitivas y confirmación de su idoneidad:

En el IPBLN el cultivo in vitro de las líneas modificadas genéticamente se llevará a cabo en laboratorios de bioseguridad nivel 3 y conforme a las Buenas Prácticas de Laboratorio del centro. Ésta instalación ya ha sido notificada con nº A/ES/19/I-17

- 5) Determinación del riesgo en el caso de que se produzca una liberación accidental:

(Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto).

- a) Información adicional relativa a la ubicación de la instalación (proximidad a fuentes de peligro potenciales, condiciones climáticas predominantes, etc.)

N/A

- b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

El trabajo con parásitos vivos se realiza siempre en cabinas de flujo de bioseguridad. Los tubos u otros contenedores que contengan parásitos vivos no pueden abrirse fuera de la cabina. Se deben utilizar doble guantes protectores y batas hidrófobas siempre que se manejen parásitos vivos. Si es necesario centrifugar, se utilizan tubos sellados. Es importante evitar todos los objetos que puedan ser punzantes (vidrio o metal).

- c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales. Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso

- d) Planes de emergencia. Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso