



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

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: [Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra](#)
Dirección postal: [Avd/Conocimiento, 17-Armilla; CP: 18016-Granada](#)

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: [Mario Delgado Mora](#)
NIF: [08034904-S](#)
Cargo: [Director](#)
Tel: [611607777](#)
Fax:
Correo electrónico: mdelgado@ipb.csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: [Francisco José Sánchez Luque](#)
NIF: [30950545-C](#)
Cargo: [Investigador Principal – Doctor Contratado Programa EMERGIA](#)
Tel: [633161680](#)
Fax:
Correo electrónico: francisco.sanchez@genyo.es (hasta [31/12/21](#));
sanchezluquefj@ipb.csic.es (desde [01/01/22](#)).

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

Nombre y apellidos: [Mario Delgado Mora](#)
NIF: [08034904-S](#)
Cargo: [Director](#)
Tel: [611607777](#)
Fax:
Correo electrónico: mdelgado@ipb.csic.es; mariafarma@ipb.csic.es

e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: mdelgado@ipb.csic.es

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 NO

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

-Nombre de la convocatoria:

-Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

-Organismo financiador:

3) 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: 20/08/2019

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

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

Identificación de motivos de secuencia en el DNA proviral de VIH y estudio de su papel en la interacción con los sistemas de regulación genética (y epigenética) de las células infectadas.

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 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

Tipo 4

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.



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

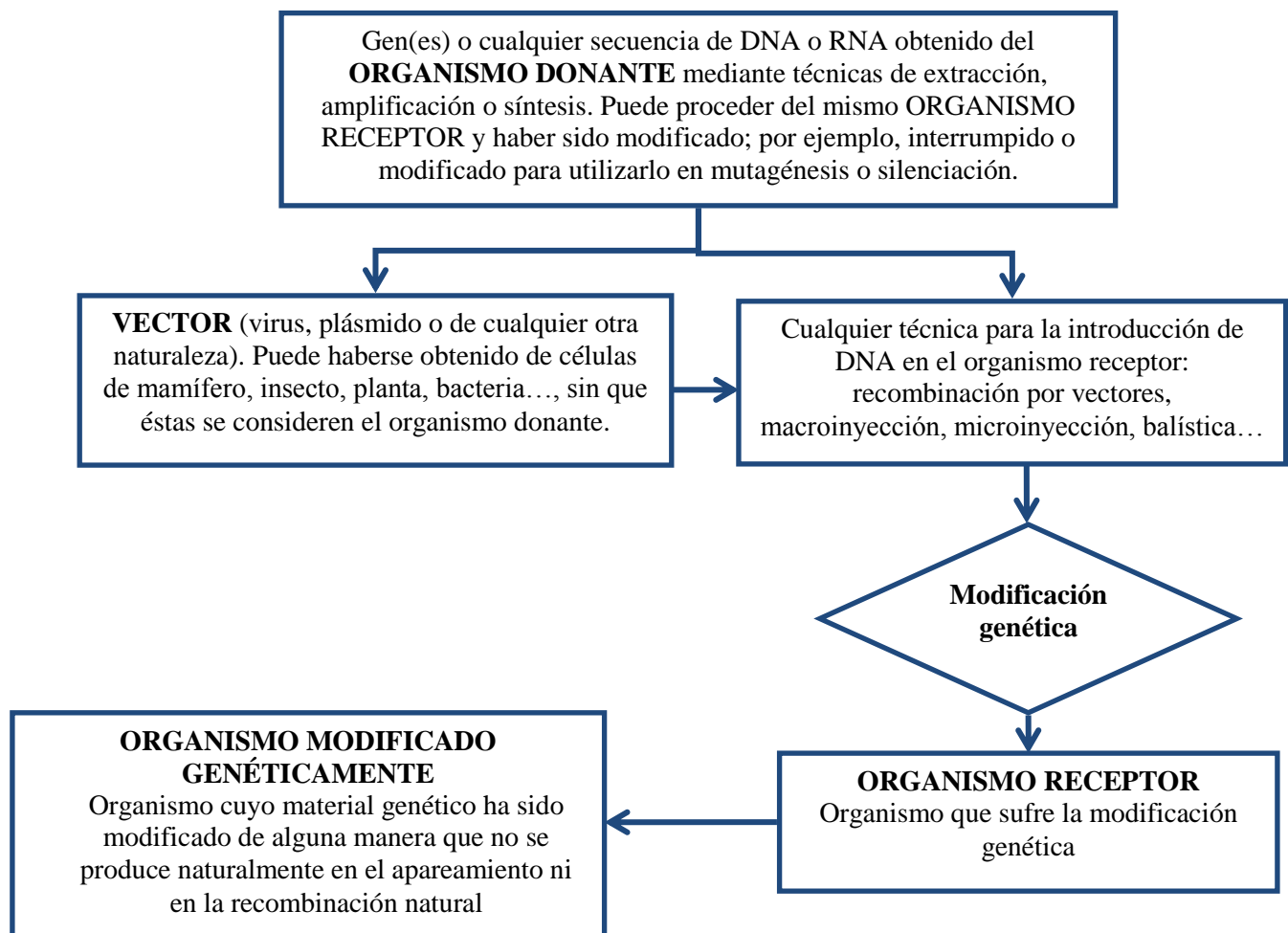
ORGANISMO DONANTE: Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

VECTOR: Plásmidos portadores de la secuencia de DNA proviral del VIH.

Modificación genética: Alteraciones en la secuencia del genoma del VIH (alteración de la secuencia, deleciones o inserciones de secuencia).

ORGANISMO RECEPTOR: Genoma proviral de VIH (en plásmido vector); y cultivos celulares de líneas humanas ya establecidas.

ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE: Partículas virales (viriones) portadores de un genoma de VIH modificado.





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

1) Nombre científico:

Líneas celulares establecidas procedentes de *Homo sapiens* (i.e. HEK293T, HeLa).

Taxonomía: Dominio Eukarya; Reino Animalia; Filo Chordata; Clase Mammalia; Orden Primates; Familia Hominidae; Genero *Homo*.

Nombre común: Humano (líneas celulares humanas).

Nombre científico:

Vector plasmídico con el DNA proviral del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Taxonomía: Dominio *Riboviria* – Grupo VI (Virus de RNA monocatenario retrotranscrito) – Reino *Pararnavirae* – Orden *Ortevirales* – Familia *Retroviridae* – Género *Lentivirus*.

Nombre común: Virus de la Inmunodeficiencia Humana, VIH, Virus del SIDA (SIDA=Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida).

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

Las líneas celulares humanas immortalizadas para este trabajo son líneas comúnmente usadas en laboratorios de investigación a nivel mundial por varias décadas (i.e., la línea HEK293 fue establecida originariamente por Graham FL, *et al. J Gen Virol* en 1977, y la línea HeLa lo fue por Scherer WF, *et al. J Exp Med* en 1953). Estas células pueden adquirirse desde el repositorio de la *American Type Culture Collection* (ATCC) o a través de colaboradores.

El DNA proviral de diferentes aislados de VIH clonados en vectores plasmídicos, ha sido obtenido generalmente desde DNA genómico extraído de células humanas infectadas. Como ejemplo, el vector tipo pNL4.3 (ver abajo V.4.c) porta la secuencia proviral de un aislado de VIH obtenido de librerías de DNA genómico preparadas desde DNA aislado de linfocitos de sangre periférica de pacientes infectados (Adachi *et al. J. Virol.* 1986). En nuestro caso, estos vectores plasmídicos serán obtenidos comercialmente o de colaboradores, y gracias a la existencia de un marcador de resistencia a ampicilina en el *backbone* del vector, pueden expandirse en cultivos bacterianos de *Escherichia coli* y extraerse mediante preparaciones de tipo mini, midi o maxiprep.

b) Técnicas de identificación:

En la página web de la ATCC puede obtenerse información detallada acerca de los marcadores para identificación de las distintas líneas celulares humanas immortalizadas



(i.e. <https://www.atcc.org/products/crl-1573>; <https://www.atcc.org/products/crl-3216>; <https://www.atcc.org/products/ccl-2>).

Para el plásmido vector continente del DNA proviral, éste puede confirmarse mediante su secuenciación directa (i.e. secuenciación capilar Sanger) o mediante genotipado por PCR usando *primers* específicos frente a marcadores de secuencia de la cepa clonada (ver marcadores genéticos en III.2.c). La secuencia completa de estos plásmidos comerciales está disponible en repositorios científicos (i.e. pNL4.3 está disponible en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* de Estados Unidos – NCBI– bajo el número de acceso AF324493.2).

c) **Marcadores genéticos:**

Como se indica en b), en la página web de la ATCC puede obtenerse esta información. Como ejemplos: (i) para la línea celular HEK293 el cariotipo más frecuente (30% de las células) es 64, los marcadores cromosómicos más frecuentes der(1)t(1;15) (q42;q13), der(19)t(3;19) (q12;q13), der(12)t(8;12) (q22;p13), junto con una inserción del extremo izquierdo del DNA de adenovirus 5 (más información en <https://www.atcc.org/products/crl-1573>); (ii) para la línea celular HEK293T (derivada de la anterior) existe una inserción del alelo tsA1609 del antígeno T largo del virus 40 vacuolado del simio o SV40; (iii) para la línea celular HeLa el cariotipo más frecuente es 82, el 98% de las células presentan un cromosoma telocéntrico pequeño y frecuentemente las células tienen los marcadores cromosómicos 1×M1, 1×M2, 4-5×M3 y 2×M4 como (más información en <https://www.atcc.org/products/ccl-2>).

Como se describe en III.2.b, la secuencia de los plásmidos portadores de DNA proviral de VIH, está disponible en repositorios científicos. De esta secuenciación, pueden deducirse los marcadores genéticos de la cepa viral originaria. El vector tipo pNL4.3 contiene una cepa viral NY5/BRU (LAV-1) y una característica genética de esta cepa es, por ejemplo, presentar un dominio DIS tipo LAI con secuencia/estructura TGAAGCGCGCACG//((.....)) en lugar de otras tipo MAL como TGACGTGCACACA//((.....)).

d) **Marcadores fenotípicos:**

Como se indica en b), en la página web de la ATCC puede obtenerse esta información. Como ejemplos: la línea celular HEK293 expresa un receptor inusual de vitronectina en superficie, compuesto de la subunidad integrina beta-1 y la subunidad receptor alpha-v de vitronectina; la inserción del alelo tsA1609 del antígeno T largo del SV40 en la línea celular HEK293T va acompañada de un gen que confiere resistencia a neomicina y geneticina (G418); y la línea celular HeLa presenta inducción de actividad AP-1 y c-jun N-terminal quinasa inducida por lisofosfatidilcolina de forma independiente de la vía de proteína quinasa C, y sus células son positivas para queratina en tinción con inmunoperoxidasa.

El vector plasmídico en sí no tiene marcadores fenotípicos como tal. La transformación de cultivos bacterianos de *Escherichia coli* les conferirán resistencia a ampicilina. La transfección de cultivos celulares permisivos para la infección (i.e. HEK293T cells)



tendrá como efecto la síntesis de partículas virales (viriones) de VIH que pueden ser detectadas mediante inmunodetección de antígenos virales (ver VI.5.a). La transfección en cultivos de células que presentan los marcadores de superficie necesarios para la infección (CXCR4 y CD4 para la cepa NL4.3), pueden desarrollar formación de sincitios visibles al microscopio óptico (i.e. células CD4⁺CXCR4⁺U87).

e) Estabilidad genética:

Como se indica en b), en la página web de la ATCC puede obtenerse esta información. Como ejemplos: para la línea celular HEK293, el cultivo se encuentra en un equilibrio en el que el cariotipo más frecuente es de 64 cromosomas y está presente en el 30% de las células, siendo la tasa de células con poliploidías mayores del 4.2% (más información en <https://www.atcc.org/products/crl-1573>); y para la línea celular HeLa el cariotipo más frecuente es 82, sin embargo el rango de cromosomas es 70-164 (más información en <https://www.atcc.org/products/ccl-2>).

Los vectores plasmídicos portadores del DNA proviral de VIH propuestos (i.e. pNL4.3) son altamente estables en su mantenimiento y manipulación en cultivos bacterianos de *Escherichia coli*.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

La historia y modificaciones de las diferentes líneas celulares disponibles en el ATCC pueden obtenerse en su página web. Como ejemplos: la línea celular HEK293 presenta una inserción de la secuencia del extremo izquierdo del DNA del adenovirus 5; y la línea celular HEK293T presenta una inserción adicional del alelo tsA1609 del antígeno T largo del SV40 que permite la replicación de plásmidos que contienen el origen de replicación del SV40.

La construcción de los vectores plasmídicos portadores del DNA proviral de VIH puede obtenerse de la información histórica depositada en repositorios como el NCBI. La construcción del vector tipo pNL4.3 se describe en Adachi *et al.* J. Virol. 1986. No se conocen modificaciones posteriores a esta construcción.

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:

No aplicable. Ni los cultivos celulares no modificados, ni el vector plasmídico portador del DNA proviral del VIH en sí presentan potencial patógeno, infeccioso o mecanismos para el acceso al interior celular. Sin embargo, la introducción artificial del vector plasmídico en dichos cultivos celulares o en alguna otra célula permisiva para la infección, puede disparar el ciclo de multiplicación viral y la producción de viriones infecciosos de VIH (descrito en VII.4) detectables tal como se describe en VI.5.a.



- 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.*):

No aplicable.

- a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?
- b) En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI NO

Porqué:

- 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:

La persona responsable de la solicitud tiene una experiencia de >18 años (>7.5 en laboratorios internacionales) en el uso de este tipo de líneas celulares. De ellos, >5 años involucran trabajos en combinación con organismos de nivel de biocontención 3 (VIH-1).

- 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:

No aplicable.

- a) Implicaciones en procesos ambientales (*p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo*):
- b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

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

No aplicable.

12) Hábitat natural del organismo:

No aplicable.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico:

Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) – *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*.

Taxonomía: Dominio *Riboviria* – Grupo VI (Virus de RNA monocatenario retrotranscrito) – Reino *Paramnavirae* – Orden *Ortevirales* – Familia *Retroviridae* – Género *Lentivirus*.

Nombre común: Virus de la Inmunodeficiencia Humana, VIH, Virus del SIDA (SIDA=Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida).

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

El material genético del virus se encuentra disponible ‘integrado’ en vectores plasmídicos convencionales, i.e.: pNL4.3 (GenBank: AF324493.2), vector derivado de pUC y portador de la secuencia de DNA proviral de la cepa NL4.3 de VIH tipo 1 (VIH-1).

3) Método de obtención:

- a) Extracción Referido a la producción y expansión de los plásmidos mencionados en IV.2 que tiene lugar en cultivos bacterianos de laboratorio (i.e. *Escherichia coli* DH5 α) sin que ello suponga la presencia del organismo patógeno VIH. El DNA plasmídico puede obtenerse mediante técnicas convencionales de preparación de DNA (mini, midi o maxiprep).



b) PCR

c) Síntesis *in Vitro*

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

Replicación viral.

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?

Infección de células T CD4⁺, macrófagos y células dendríticas, que lleva a la reducción de los niveles de las mismas y finalmente a una pérdida de la inmunidad celular que hace al organismo susceptible de diferentes tipos de cáncer e infecciones oportunistas.

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

Sí.

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

Sí, en el caso de las líneas celulares humanas establecidas.

No, en el caso de la línea celular bacteriana *Escherichia coli*.

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

a) Inserción de material genético

b) Deleción de material genético

c) Sustitución de bases

d) Fusión celular



e) Otros, especifíquese

2) Finalidad de la modificación genética:

Estudio de la interacción entre el material genético viral (VIH) y los mecanismos de regulación de la expresión génica (incluyendo epigenética) de la célula hospedadora.

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

Mutagénesis dirigida en la secuencia de DNA proviral contenida dentro del tipo de vectores plasmídicos descritos abajo en VI.7 (i.e. pNL4.3). Una vez introducida la mutación, el OMG propiamente dicho, partículas infectivas virales, se obtiene de sobrenadantes celulares tras la transfección (i.e. mediante agentes poliaminas como *Lipofectamine* -Invitrogen- o FuGENE -Promega-) de cultivos celulares permisibles para la infección (i.e. células adherentes HEK293T o CD4⁺CXCR4⁺U87, etc. o células en suspensión como Jurkat) con los plásmidos portadores del DNA proviral.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector: El vector es un plásmido, tipo pNL4.3 (GenBank AF324493.2).

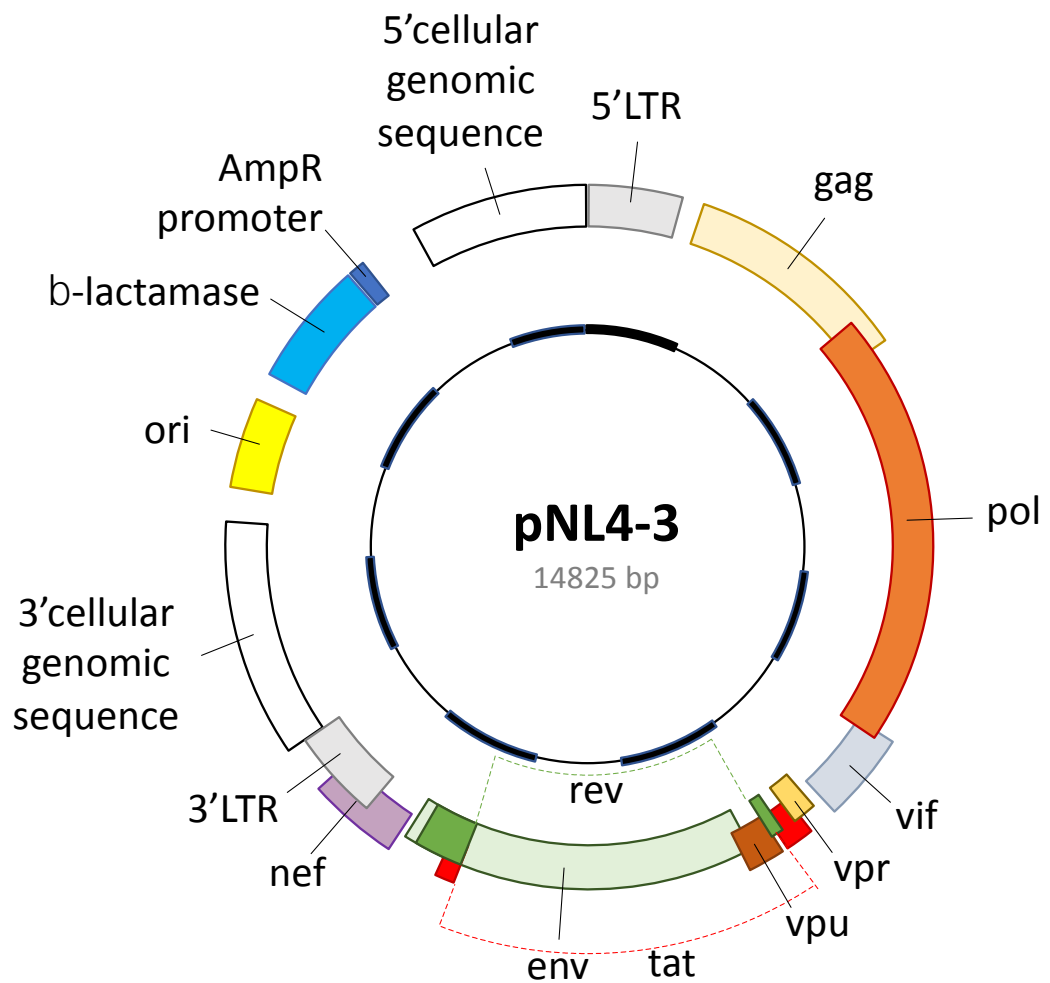
b) Si se trata de un virus:

No aplicable.

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*):

Adjunto es el mapa del vector tipo pNL4.3, cuya secuencia completa y descripción pueden encontrarse en GenBank AF324493.2 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF324493>).



d) Gama de hospedadores del vector:

Vector artificial para uso de laboratorio, comúnmente expandido en cultivo de *E. coli*.

e) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

No aplicable.

ii) Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?

No aplicable.

iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?

Sí.

5) Información del inserto:



Las modificaciones consistirán en sustituciones de nucleótidos, pequeñas deleciones e inserciones de nucleótidos para deshabilitar/potenciar la función de motivos de secuencia presentes en la secuencia del DNA proviral que está ya clonada en el vector pNL4.3 arriba. No existe, por tanto, un inserto propiamente dicho procedente de una secuencia natural presente en otro organismo.

- a) Dimensiones del inserto, mapa de restricción y secuencia:
- b) Origen y función específica de cada parte del inserto:
- c) Descripción del método utilizado para la transformación:
- d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto:
- e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:
- f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?
- g) ¿Contiene secuencias que no son necesarias para la función deseada? En caso afirmativo, especifíquese.
- h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.

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. Está integrado en el RNA genómico / DNA proviral del virus.

En caso afirmativo:

- i) número de copias: 2/virión.
- ii) localización cromosómica: A lo largo del cromosoma viral.
- iii) secuencias colindantes: Potencialmente, secuencias involucradas en la regulación de la expresión génica.



iv) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?: *Se desconoce.*

c) Si se trata de un virus:

No. El OMG es un virus pero la forma de modificarlo (inserto o modificación) no es mediante un 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*):

No aplicable.

iv) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

v) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

vi) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)

Aportar toda la documentación al respecto.

2) Características genéticas y fenotípicas modificadas del organismo receptor como resultado de la manipulación genética:

Los organismos receptores son las líneas celulares humanas establecidas (i.e. HEK293T) que van a recibir el plásmido y éste va a dirigir la síntesis del OMG: partículas virales con genoma viral modificado.

a) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo? En caso afirmativo, especifíquese:

El OMG virión no puede sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo, a no ser que infectando un hospedador natural de VIH (humano) y, en todo caso, condicionado al efecto de la modificación genética introducida que se desconoce.

Las líneas celulares humanas establecidas (organismo receptor), tras recibir o no el vector plasmídico modificado, no pueden sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo.

b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese:

El OMG (virión) corresponde a un virus que requiere de células humanas para multiplicarse. La compleción del ciclo viral dura aprox. 24hr, no diferenciándose del virus no modificado.



Las líneas celulares humanas establecidas (organismo receptor), tras recibir o no el vector plasmídico modificado, se replican en condiciones de cultivo ideales aproximadamente cada 24hr.

- c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar:

La patogenicidad del OMG respecto del VIH sin modificar vendrá condicionada por el efecto de las mutaciones introducidas en su secuencia (*a priori* desconocido). Posee, por tanto, potencial para infectar al ser humano.

Las líneas celulares humanas establecidas (organismo receptor) no son en sí infectivas o nocivas para el ser humano, animales o plantas; aunque una vez transfectadas con el plásmido portador del DNA proviral modificado, están inherente unidas a la producción de partículas virales infectivas y, por tanto, deben manejarse con el mismo nivel de contención biológica que el organismo donador.

- d) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese:

No aplicable.

- e) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese:

No.

- f) Marcadores específicos del OMG:

Motivos de secuencia específicos presentes en el DNA proviral del VIH potencialmente involucrados en la interacción entre el material genético viral y los sistemas de regulación de la expresión génica de la célula hospedadora (i.e. sitios de unión a factores de transcripción como YY1 o CTCF).

- 3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):

El DNA proviral en el vector plasmídico es altamente estable y será utilizado cada vez para la producción de *stocks* virales tal como se describe abajo en el apartado VI.7. La expansión viral mediante reinfección de cultivos está sujeta a mutagénesis natural durante la replicación viral, y no será utilizada para mantenimiento de *stocks* virales.

- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos:

El OMG no presenta, *a priori*, diferente capacidad para integrar su material genético en células infectadas que el organismo *wild-type* (VIH), a no ser que las mutaciones introducidas afecten a ésta.



5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:

- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: La identificación del plásmido portador del DNA proviral puede realizarse mediante técnicas convencionales de genotipado por PCR (amplificación de secuencias específicas del vector y la cepa viral presentes en el plásmido), mapeo de restricción o secuenciación capilar Sanger del mismo. En todos los casos, puede hacerse uso de las modificaciones genéticas introducidas para identificar el plásmido modificado.

La identificación de las partículas virales infectivas en los sobrenadantes celulares puede hacerse mediante técnicas de inmunodetección de los componentes virales, como por ejemplo, mediante *enzyme immunoassay* (EIA) frente al antígeno viral p24 con kits comerciales (i.e. Greenscreen HIV-1 Ag Enzyme Immunoassay -Bio-Rad-). *A priori*, estos métodos no permiten detección diferencial entre organismo modificado y *wild-type*. Sin embargo, puesto que la producción de partículas virales parte de DNA plasmídico clonal aislado y purificado, no cabe opción de generar la variante modificada y la variante *wild-type* en el mismo cultivo celular. No obstante, la confirmación de la variante modificada en las partículas virales puede hacerse mediante amplificación por reverso transcripción *in vitro* acoplada a PCR, usando RNA extraído del sobrenadante viral (i.e. mediante Trizol Reagent -Invitrogen-); o PCR directamente sobre DNA genómico de cultivos celulares infectados por el OMG a identificar.

- b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente:

No aplicable.

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

- a) Enseñanza
- b) Investigación
- c) Desarrollo

2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

No aplicable.

- a) Volumen máximo en el caso de microorganismos:
- b) Número de plantas:
- c) Número de animales:

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

Del 1 de Enero de 2022 al 31 de Diciembre de 2026 (total de 4 años).



(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:

Ensayo de modificaciones en diferentes motivos de secuencia dentro del DNA proviral de VIH para el estudio de sus funciones en la interacción entre el material genético del virus y los mecanismos de regulación de la expresión génica de las células infectadas. Los diferentes OMG consistirán en *stock* virales producidos mediante transfección de versiones mutadas del plásmido vector tipo pNL4.3 en cultivos celulares no re infectables (i.e. HEK293T) y la utilización de estos *stocks* para la infección de cultivos celulares tipo Jurkat y el estudio de la expresión viral de cada uno de los mutantes. Este estudio puede hacerse, entre otras, mediante técnicas de cuantificación directa del antígeno viral p24 en el sobrenadante, de la expresión viral mediante RT-qPCR, o del silenciamiento epigenético de las integraciones provirales mediante tratamiento con bisulfito y PCR.

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:

No aplicable.

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*):

No aplicable.

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*):

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/>



Los OMG propiamente dichos se generarán desde vectores plasmídicos portadores de la secuencia de DNA proviral modificada. Estos plásmidos serán transfectados en cultivos de líneas celulares humanas establecidas permisibles para la infección (i.e. HEK293T, CD4⁺CXCR4⁺U87, Jurkat) mediante el uso de agentes como *Lipofectamine* (Invitrogen) o FuGENE (Promega), dando lugar a cultivos celulares con la capacidad transitoria de producción de viriones del OMG. Los OMG (viriones o partículas virales portadoras de genomas modificados) serán liberados al sobrenadante de estos cultivos. El sobrenadante de cultivos adherentes es recolectado por aspiración y, en el caso de cultivos en suspensión, es obtenido mediante centrifugación de cultivos para el precipitado de las células (3000×g, 4°C, 5min). Los *stocks* virales pueden filtrarse a través de filtros de 22µm para una mayor eliminación de restos subcelulares y almacenarse en viales a -80°C. Estos *stocks* virales infectivos pueden utilizarse para infectar cultivos de células sensibles para la infección. Por ejemplo, para cepa NL4.3 (de tipo X4), son infectables los tipos celulares que expresan los marcadores de superficie CD4 y CXCR4 (como Jurkat, CD4⁺CXCR4⁺U87). Las infecciones suelen hacerse con volúmenes de *stock* equivalentes a 0.4ng de antígeno viral p24 cuantificado, para ~8x10⁵ células.

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

Los OMG serán generados y manipulados en las instalaciones de nivel de contención biológica 3 (NCB3) del Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López-Neyra' (IPBLN; CSIC, Granada) que ha sido autorizada con N° de Notificación A/ES/19/I-17. Las medidas aplicadas seguirán la normativa del IPBLN específica en esta materia para prevenir el escape de agentes biológicos durante la entrada de personal o la introducción de material en la sala. La manipulación de los cultivos ocurrirá en cabinas de flujo laminar de bioseguridad clase II; los cultivos serán mantenidos en incubadoras con sello hermético; y siempre se usarán placas de cultivo con tapadera y frascos con tapón de rosca. El personal será provisto de equipos de protección individual desechables, de acuerdo a normativa, para su uso dentro de la instalación.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

No hay ninguna fuente de peligro potencial.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

No aplicable.

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 la instalación NCB3 del IPBLN, que ha sido autorizada con N° de Notificación A/ES/19/I-17.

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



b) gestión por una empresa externa: SÍ NO

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:

La información detallada sobre estos programas se encuentra en la parte B relativa a la Instalación, que ya fue aportada para el expediente con N° de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso. Brevemente, los residuos sólidos serán dispuestos en bolsas de contención de acuerdo a la normativa. Los residuos líquidos serán inactivados dentro de la instalación mediante el uso de agentes específicos (i.e. Virkon, hipoclorito sódico), por el personal investigador. Tras esto, ambos tipos de residuos serán inactivados/autoclavados dentro de la propia Instalación por el personal del Servicio de Cultivos Celulares y del Servicio de Lavado y Esterilización del IPBLN. Los residuos se sacarán entonces de la Instalación mediante una exclusiva con sistema de aire estéril (SAS; provisto de lámparas ultravioleta para irradiación completa de la superficie de los residuos), y serán finalmente retirados por la empresa externa Stericycle, que procederá a su gestión final.

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

- 1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

El uso de la instalación NCB3 del IPBLN, los equipamientos especiales para trabajo con organismos NCB3 dentro de la misma (i.e. cabinas de bioseguridad clase IIA; centrífugas con cestillos de seguridad; etc.), el equipamiento de protección individual disponible y el entrenamiento para el trabajo de acuerdo con las prácticas de bioseguridad necesarias no anticipan ninguna situación proclive a accidentes.

- 2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Cabina de flujo laminar de bioseguridad clase II, centrífugas con cestillos de seguridad, soluciones inactivantes y desinfectantes (i.e. Virkon, hipoclorito sódico, etanol 70%), y equipamiento de protección individual consistente en doble guante, mono hidrofóbico, doble cubrecalzado desechable y gafas.

- 3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

La información suministrada será la registrada en la normativa del IPBLN para el trabajo en la instalación NCB3. La información será suministrada por la persona responsable del Comité de Seguridad Biológica del IPBLN y por la persona responsable de la solicitud. Esta información incluye las buenas prácticas de trabajo en una instalación NCB3, un plan de formación para trabajar en el laboratorio NCB3, junto con una visita guiada para asegurarse de la correcta comprensión de la forma de trabajar dentro del laboratorio NCB3.

- 4) Planes de emergencia:



De acuerdo a la normativa del IPBLN. La información detallada sobre estos planes se encuentra en la parte B relativa a la Instalación, que ya fue aportada para el expediente con N° 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: [Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra](#)
Dirección postal: [Avd/Conocimiento, 17-Armillá; CP: 18016-Granada](#)

- 2) Representante legal de la entidad
Nombre y apellidos: [Mario Delgado Mora](#)
NIF: [08034904-S](#)
Cargo: [Director](#)
Tel: [611607777](#)
Fax:
Correo electrónico: mdelgado@ipb.csic.es

- 3) Responsable científico de la actividad
Nombre y apellidos: [Francisco José Sánchez Luque](#)
NIF: [30950545-C](#)
Cargo: [Investigador Principal – Doctor Contratado Programa EMERGIA](#)
Tel: [633161680](#)
Fax:
Correo electrónico: francisco.sanchez@genyo.es (hasta 31/12/21); sanchezluquefj@ipb.csic.es (desde 01/01/22).

- 4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
Nombre y apellidos: [Mario Delgado Mora](#)
NIF: [08034904-S](#)
Cargo: [Director](#)
Tel: [611607777](#)
Fax:
Correo electrónico: mdelgado@ipb.csic.es; mariafarma@ipb.csic.es

- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: mdelgado@ipb.csic.es

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:

La generación de OMG derivados del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) portadores de mutaciones en motivos de secuencia localizados a lo largo del genoma viral para estudiar el papel de dichos motivos en la interacción entre el material genético viral y los sistemas de control de la expresión génica de las células infectadas.

2) Duración prevista de la actividad:

4 años.

(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. Los organismos receptores son un vector plasmídico portador del DNA proviral de VIH (i.e. pNL4.3) y líneas celulares humanas establecidas (i.e. HEK293T), que van a ser usadas respectivamente como soporte para la introducción de las modificaciones y como 'factorías' para fabricar las partículas virales de VIH portadoras del genoma viral modificado (OMG propiamente dicho). Las líneas celulares humanas utilizadas no van a influir en las propiedades nocivas del OMG, ni van a tener ningún otro efecto distinto al que tendrían con el organismo no modificado (VIH). La forma en que el organismo receptor VIH (aquí en forma de vector plasmídico) influencia las propiedades nocivas del OMG se discute en el siguiente apartado, pues este organismo receptor y el organismo donante son el mismo.



- b) **Organismo donante.** El tipo de modificaciones genéticas van consistir en la mutación por sustitución de bases o inserción/delección de secuencias reguladoras sintetizadas artificialmente. De este modo, el organismo donante (si existiera), no se va a utilizar físicamente en la experimentación y no va a influir en las propiedades nocivas del OMG. En cuanto al organismo donante del material genético básico sobre el que practicar las mutaciones, éste es conceptualmente VIH pues se usarán plásmidos que contienen una copia de DNA proviral. VIH es un virus humano que infecta células T CD4⁺, macrófagos y células dendríticas, y lleva a la reducción de los niveles de las mismas y finalmente a una pérdida de la inmunidad celular que hace al individuo susceptible de diferentes tipos de cáncer e infecciones oportunistas. Al ser el OMG un VIH modificado, tiene potencial para presentar algunas o todas las propiedades nocivas de VIH.
- c) **Inserto.** Como se indica en b), las modificaciones genéticas consistirán en mutaciones artificiales (sustitución de bases e indels de secuencias reguladoras) que en sí no tienen un potencial nocivo.
- d) **Vector.** El vector utilizado es el *backbone* de un DNA plasmídico y no se espera que afecte el carácter nocivo del OMG.
- e) **Organismo modificado genéticamente resultante.** Si bien, como se dice en c), las mutaciones no tienen un carácter nocivo, su implementación en el OMG va encaminada a alterar motivos de secuencia naturales del VIH involucrados en la interacción entre el material genético viral y los sistemas de regulación de la expresión génica de la célula infectada. Estas mutaciones tienen, por tanto, el potencial de alterar los niveles de expresión del OMG modificado en la célula infectada e incrementar o disminuir su virulencia en comparación con el VIH *wild-type*.
- f) **Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.** *A priori*, los OMGs tienen el potencial de presentar los mismos o parte de los efectos que el VIH en relación con la salud humana, si bien pueden presentar distinta incidencia dependiendo del efecto de las mutaciones introducidas en la regulación genética del virus.
- g) **Efectos para el medio ambiente.** No aplicable.

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).

No se anticipa que se puedan producir efectos nocivos relacionados con las características de las actividades realizadas. Las características de la instalación de nivel de contención biológico 3 (NCB3) presente en el IPBLN, el equipamiento de protección individual, los materiales para limpieza y desinfección, y la aplicación de la normativa para el trabajo con agentes NCB3 y para el mantenimiento y procesamiento de los residuos en esta instalación, están diseñados para prevenir cualquier tipo de accidente.

b) Concentración y escala utilizadas.

El diseño experimental minimiza la concentración y escala de utilización de los OMG, y no se anticipa ningún efecto nocivo derivado de estos factores en las condiciones de trabajo descritas arriba.

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).

No se anticipa que se produzcan efectos nocivos en relación con las condiciones del cultivo del OMG.

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

Los OMG van a consistir en partículas virales (o viriones) portadores de un genoma modificado. Estas modificaciones estarán orientadas para tener un efecto post-integrativo en la regulación de la expresión génica viral en un curso de infección normal en cultivos celulares, pero en principio, la infectividad de los viriones no debe cambiar respecto del VIH *wild-type*. Por esto, no anticipamos que los OMG deben tener un nivel de contención biológica superior al VIH *wild-type*, que está catalogado como de nivel 2* en el Anexo II del Real Decreto 644/1997. Es por eso que la instalación NCB3 del IPBLN (autorizada con N° de Notificación A/ES/19/I-17) excede los requisitos necesarios para trabajar con estos OMG.

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.).

La instalación NCB3 se encuentra situada en una ubicación central y segura en el edificio, aislada de fuentes de peligro potenciales y en unas condiciones ambientales controladas. La entrada de personal e introducción de materiales está regulada por exclusas de doble puerta, sistema de presión y filtrado de aire que previenen el flujo de aire entre la instalación y el exterior, exclusiva provista de lámparas de ultravioleta y sistema de aire estéril (SAS) para introducir/extraer



materiales, y no existen sumideros u otras vías que comuniquen el ambiente de la instalación con el exterior. La normativa del instituto prohíbe la extracción de ningún organismo patógeno vivo (o activo) de las instalaciones. Por tanto, no se anticipa riesgo de liberación accidental de los OMG en relación con la ubicación de la instalación.

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

El uso de la instalación NCB3 del IPBLN, los equipamientos especiales para trabajo con organismos NCB3 dentro de la misma (i.e. cabinas de flujo laminar de bioseguridad clase II; centrífugas con cestillos de seguridad; etc.), el equipamiento de protección individual disponible y el entrenamiento para el trabajo de acuerdo con las prácticas de bioseguridad necesarias no anticipan ninguna situación proclive a accidentes.

c) **Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales.**

Cabina de flujo laminar de bioseguridad clase II, centrífugas con cestillos de seguridad, soluciones inactivantes y desinfectantes (i.e. Virkon, hipoclorito sódico, etanol 70%), y equipamiento de protección individual consistente en doble guante, mono hidrofóbico, doble cubrecalzado desechable y gafas.

d) **Planes de emergencia.**

Los planes de emergencia se contemplan en la normativa del Instituto. La información detallada sobre estos planes se encuentra en la parte B relativa a la Instalación, que ya fue aportada para el expediente con N° de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso. Brevemente, los organismos receptores no tienen capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo, y los OMG tampoco siempre que no entren en contacto con humanos por las vías naturales de contagio de VIH. Las propiedades de la Instalación NCB3 y los equipos de protección individual previenen esta situación. En el caso particular de vertidos accidentales en la instalación NCB3, se prevé que éstos ocurran en las cabinas de flujo laminar de bioseguridad clase II, que es donde se contempla el que los contenedores de los cultivos (frascos, placas de Petri) sean abiertos por el personal investigador. Los vertidos líquidos serán inactivados mediante el uso de agentes químicos específicos (i.e. Virkon, hipoclorito sódico, etanol 70%) y retirados mediante los sistemas de aspiración con tanques dispuestos con agentes inactivantes o mediante papel absorbente que será entonces procesado como un residuo sólido.