



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

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CSIC-UAM)
Dirección postal: C/ NICOLAS CABRERA 1, 28049 MADRID

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: LOURDES RUIZ DESVIAT
NIF: 05253811J
Cargo: DIRECTORA
Tel: 911964424
Fax:
Correo electrónico: direccion@cbm.csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: NÚRIA GIRONÈS PUJOL
NIF: 46327626Z
Cargo: PROFESORA TITULAR
Tel: 34 911964593
Fax:
Correo electrónico: ngirones@cbm.csic.es

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

Nombre y apellidos: GEMA CAPARRÓS DE LA JARA
NIF: 05432793D
Cargo: RESPONSABLE DE BIOSEGURIDAD
Tel: 911964537
Fax:
Correo electrónico: gcaparros@cbm.csic.es

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



- 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: Proyectos de Generación de Conocimiento 2021.
- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: PID2021-123389OB-I00, Dra. Núria Gironès Pujol.
- Organismo financiador: Ministerio de Ciencia e Innovación.

- 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:

Cultivos Nivel de Bioseguridad tipo 3 (BSL3): 15/09/2010

Animalario BSL3: 07/07/2011

- b) Número de referencia del expediente:

Cultivos BSL3: A/ES/17/I-22

Animalario BSL3: A/ES/17/I-23

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.



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

Utilización confinada de cepas de *Trypanosoma cruzi* modificados genéticamente tiene la finalidad de descubrir nuevos factores de virulencia y/o dianas terapéuticas para ello planteamos 2 objetivos principales:

a) Mejorar la detección del parásito en experimentos de infección en cultivos celulares y en ratones mediante el uso de *Trypanosoma cruzi* fluorescente/bioluminiscente, mediante microscopia e imagen *in vivo*, respectivamente.

b) Estudiar el efecto de la sobreexpresión en *T. cruzi* de un gen propio del parásito que pertenece a la gran familia de las Transialidasas (TS) sobre el proceso infectivo. La mayoría de TSs de *T. cruzi* cortan ácido siálico de las proteínas del huésped y lo incorporan a las suyas, ya que no pueden sintetizarlo ellos mismos. Algún miembro de la familia de las TSs se postula como candidato vacunal y la TS que vamos a sobreexpresar se postula como ligando del receptor inmune SLAMF1, implicado en el proceso de infección (Calderon J y col. Plos Pathogens 2012; Poveda C y col. Plos Neglected Tropical Diseases 2020), por lo que las infecciones, tanto *in vitro* como *in vivo*, con el parásito sobreexpresa la TS nos permitirían dilucidar si es un factor de virulencia de *T. cruzi*.

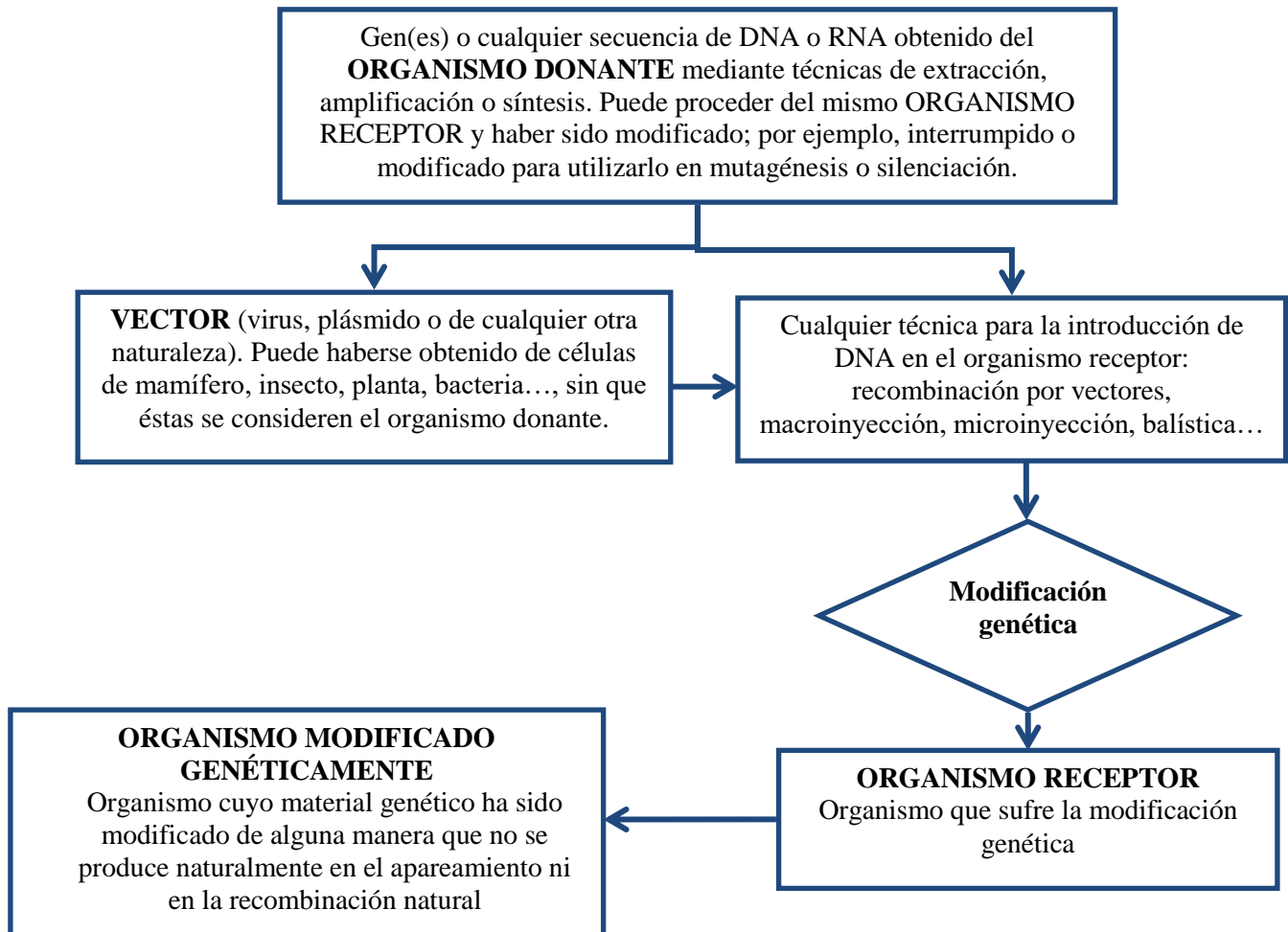
2) Clasificación de la actividad:

(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



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*.

Taxonomía: *Trypanosoma cruzi*.

Especie: *Trypanosoma cruzi*

Género: *Trypanosoma spp.*

Reino: Protista

Clase: Kinetoplastidos

Familia: Trypanosomatidae

Nombre común: *Trypanosoma cruzi*.

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- a) Técnicas de aislamiento: las cepas que utilizamos se aislaron hace décadas mediante cultivo en el laboratorio a partir de muestras de sangre de vertebrados infectados, incluidos pacientes humanos o del insecto vector de la enfermedad de Chagas y fueron clonadas mediante dilución límite.
- b) Técnicas de identificación: microscopio óptico y de fluorescencia, y PCR.
- c) Marcadores genéticos: RNA ribosomal, DNA mitocondrial, y secuencias génicas concretas.
- d) Marcadores fenotípicos: fluorescencia, forma de su cuerpo celular y flagelo.
- e) Estabilidad genética: sí.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores: ninguna.

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: Seres humanos y diversos vertebrados.



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.*):

a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad? Afectaciones cardíacas y/o digestivas. Con menor frecuencia afecciones neurológicas.

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

SI NO

Porqué: El parásito permanece de forma crónica en los pacientes, y hay pacientes que nunca sufren síntomas a lo largo de su vida. Sin embargo, cada paciente puede responder de forma distinta

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

8) Experiencia adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor: Experiencia desde el año 1993 en la investigación con dicho parásito en condiciones BSL3.

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: *Triatominae*.



- e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: Se sabe que desde que el Triatomino vector de la enfermedad se contagia de un huésped infectado con *T. cruzi*, pasan 30 días hasta que puede infectar a otro huésped.

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

- a) Implicaciones en procesos ambientales (*p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo*): Ninguna.
- b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos: Infecta muchas especies distintas de animales, los insectos son portadores, otros animales vertebrados y los seres humanos sufren la denominada enfermedad de Chagas.

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

El insecto vector es endémico en Latino América y sur de los Estados Unidos, por lo que el organismo receptor se distribuye en dichas zonas. Los ecosistemas son variados con 30-80% humedad y 24-28 °C de temperatura. Aunque debido a movimientos migratorios humanos hay casos importados en todo el mundo.

12) Hábitat natural del organismo:

Zonas selváticas y rurales donde se distribuyen las especies de triatomos vectores de la enfermedad, ocasionalmente algunas zonas urbanas periféricas a zonas selváticas en Latino América y sur de los Estados Unidos.



IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

Realmente no hay organismo donante, sino fragmentos de ADNc. A continuación, describimos el origen de los ADNc utilizados para las modificaciones de *T. cruzi* para cada uno de los objetivos planteados en el **apartado II**. Para el primer objetivo, utilizaremos cepas de *T. cruzi* transgénicas capaces de emitir fluorescencia y bioluminiscencia por la integración de los genes mNeonGreen (neoGreen) y de la luciferasa *Red-shifted* (Luc) provenientes del vector pTRIX-Luc-NeoGreen (pTRIX-LNG) (Costa FC y col. Pntd 2018; Branchini BR y col Analytical Biochemistry 2005). Para el segundo objetivo se extrajeron, por un lado, el ADNc de una TS de *T. cruzi*, y por otro lado como control un fragmento de dicha TS (Δ TS), ambos generados por síntesis química, a partir de los correspondientes plásmidos pCDNA3-TS y pCDNA3- Δ TS, respectivamente (Genscript), y se subclonaron en el plásmido pTRIX-LNG (Costa FC, y col. Pntd 2018) mediante el corte de enzimas de restricción y sustitución del gen Luc por los ADNc TS y Δ TS para su sobreexpresión en *T. cruzi* siendo seleccionados los parásitos que incorporan los plásmidos por la adición de hygromicina a los cultivos. En este caso se obtienen 2 líneas de parásitos que han perdido la capacidad de emitir bioluminiscencia (pierden Luc) pero emiten fluorescencia (conservan NeoGreen) y sobreexpresan la TS y Δ TS, respectivamente.

1) Nombre científico:

Origen de los genes clonados en los plásmidos pTRIX-Luc-NeoGreen:

- La secuencia de mNeonGreen (neoGreen) proviene de *Branchiostoma lanceolatum* (<https://reagents.allelebiotech.com/mneongreen-1/>)

Nombre científico: *Branchiostoma lanceolatum*.

Taxonomía.

Género: *Branchiostoma*

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Orden: Amphioxiformes

Familia: *Branchiostomidae*

Nombre común: Pez lanceta

- *Red-shifted* (Luc) es un mutante sintético de NanoLuc (Yeh HW et al. Nat Meth 2017). La secuencia de Nanoluc proviene de la *Deep sea shrimp Oplophorus gracilirostris* (URL: <https://www.promega.es/resources/technologies/nanoluc-luciferase-enzyme/>)

Taxonomía.



Nombre científico: *Oplophorus gracilirostris*

Género: Oplophorus

Reino: Animal

Clase: Malacostraca

Familia: Oplóforos

Nombre común: Deep sea shrimp (Camarones de aguas profundas).

- El gen de la resistencia a hygromicina proviene de *Escherichia coli* (Rao RN et al. Antimicrob Agents Chemother. 1983)

Taxonomía

Nombre científico: *Escherichia coli*

Género: *Escherichia*

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Familia: *Enterobacteriaceae*

Nombre común: No aplica.

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: DNAC.

3) Método de obtención:

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in vitro*

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

En el primer objetivo la obtención de parásitos fluorescentes/bioluminiscentes permite la detección directa mediante observación microscópica y/o imagen *in vivo* de los parásitos durante la realización de experimentos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

En el segundo objetivo, las transialidasas (TS) de *T. cruzi* están implicadas en el proceso infeccioso y se postulan como dianas vacunales. Además, la unión de la TS a la superficie de células inmunes a través del receptor SLAMF1 podría facilitar la interacción con las células huésped y la entrada del parásito en dichas células.



5) ¿Es patógeno o nocivo de cualquier otra forma (*incluidos sus productos extracelulares*) el organismo donante, vivo o muerto? Para el primer objetivo el plásmido con neoGreen, red-shifted luciferase e higromicina, NO el organismo donante no es patógeno. Para el segundo objetivo, la TS proviene de *Trypanosoma cruzi* que SI es patógeno.

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? La infección por *T. cruzi* causa una fase aguda con síntomas febriles y malestar general, puede causar miocarditis, con baja mortalidad. Tras décadas de la infección un porcentaje de pacientes desarrolla patologías cardíacas y/o digestivas, que en el primer caso se caracteriza por arritmias y muerte súbita, cardiomiopatía dilatada y fallo cardíaco.

c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo? Aún no lo sabemos, pero es una de las hipótesis.

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) Deleción de material genético
- c) Sustitución de bases
- d) Fusión celular
- e) Otros, especifíquese

2) Finalidad de la modificación genética:

Para el primer objetivo, la obtención de parásitos fluorescentes/bioluminiscentes permite la detección directa mediante observación microscópica y/o imagen *in vivo* de los parásitos durante la realización de experimentos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

Para el segundo objetivo, investigar si el transgen facilita la entrada en células inmunes y la infección, y por tanto pudiera ser un factor de virulencia.

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

En todos los casos se realizará una transfección con los plásmidos linearizados con las enzimas de restricción SacI y ScaI mediante electroporación y posterior selección con higromicina para obtener parásitos con las secuencias insertadas en su genoma.

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

SÍ NO

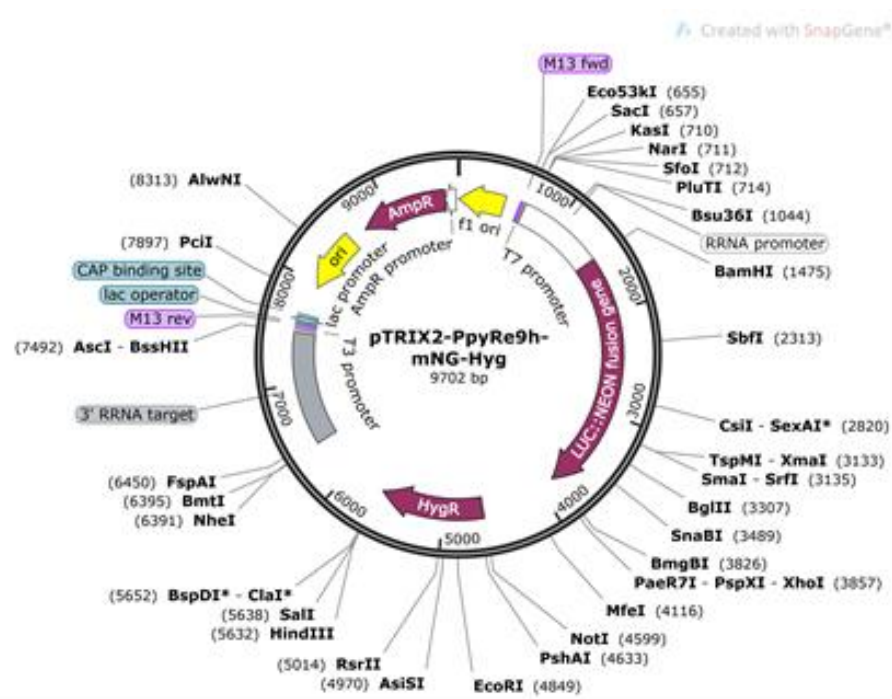
En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector: Plásmido pTRIX-LNG.

b) Si se trata de un virus: No procede.

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*):



Mapa del plásmido pTRIX-LNG (también denominado pTRIX2-PpyRe9h-mNG-Hyg).

Luc: expresar la luciferasa *Red-shifted*.

Neon fusión Green (NeoGreen): emitir fluorescencia verde para su detección.

HygR: conferir resistencia a higromicina para su selección.

Para el segundo objetivo se cortó pTRIX-LNG con las enzimas de restricción BamHI y XmaI sustituyéndose el fragmento Luc por los ADNc de la TS y Δ TS de *T. cruzi*, para obtener los correspondientes pTRIX-NG-TS y pTRIX-NG- Δ TS.

- d) Gama de hospedadores del vector: Cepas de *E. coli*.
- e) Características de la movilidad del vector: No procede.
- i) factores de movilización: No procede.
 - ii) Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?



iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?
Resistencia a ampicilina e hygromicina



cccggatgttgggggtgctgcagcaggatgctctccagctcggctggggccacctggtagccctgtactgatcaggctctcagccggccacgatgaagaagtgctgctcgtcccagtagg
cgatgctgccgctgtgcagccagccgctctgtcgaatcaggcggctgggctcgggggtttgacgtagccgctcatgatcatggggcctctcagccacagctcgcctctgtggttcacgcccag
ggtcttggcgggtgctcagggtccaccacttggcctcgaagaaggcaccacctggccacggctccgggcttgcctgcccgatgggggtcaccagatggcgctggtgctcggcagggccg
tagccctgccggatgctgagcaggtggaagcctggccacggcctgccaccctctgctcagtggggctccgagaggcgaatctgagcaggtgctcagggtgacttgcgatcagggt
gctctggccaggaaagtgaacaggggtggccaccagcggcggctggatctttagtctcagggctccgaggaacagctcctcgaacctgtacatcagcaccaccgggaagccgca
gatcaggtagcccaggggtggaacatgccgaagcctggtggaaggcaccacgctcaggatggcgctgctggggcagatctggtgccgaagatggggtcttggcgtgctgaaccgca
cgcacagggcccgggtggggcagggccacgcccctggcagggcggctgctgcccgtgctgttcatgatcaggcggatggtcttgcgggtcgaagctctgggacagaaagtactggtga
agcctggggcaggggtggctgacgaaggtgtacatgctctggaagcctggtaatggcttgcctgcatgatgatcttctgagatgatggcagcttcttgcacattcaggatcttctgca
ggcccttctgctcacgaaccacgggtgggctggctgatgtctgttcagcagctcccgcctggttagatgctggtgggtggggcagggccacggcggatgaacagggctcccagcag
ggcatgaagaactgcaggctgttctgctgctcacaccacgatccgggtggtggttgcagggctaccgcttcatggcctcggccagccgacgctcatctcgaagtactggcgtaggtgatgtt
acctgatgtgggctgctggaagcgtggtgctgaccagggcgtaccgcttcatggccttgcagctgctcggcgtgctcctccaggggtagaaggggctggtcccttct
gatgttcttctcctccatgatccactagaactctgacagactggcaccacacacaaggtggaatcacaataagggcagcagcagcagcagcaataaacaattgcacacggcatgacatttgcg
gcacaattcacgcacagccaagcgcagggagagacgataaaggtaaaatacacacaaggtggaatcacaataaaggcagcagcagcagcaataaacaattgcacacggcatgacatttgcg
accacacacaatgtacactacaattatataaaatccctccccattccggggtgcggcgaaggcccaaaaacccaatgatccacttattataaacctcactgaccaatgagccaaaa
gaaggtcgcggcgcacacgatacggcgtgcgaacaaaagaccgcaaaaaaaaacgaaaaaccaacatctgagggacaccgattcctccgacggccactggggcaccggagaga
ataccgctccatgatgtactagacacaaatggacggttaaaaaagcacaaagtgtgatcgaaccccgaaccccaaaaatfttttaggggtaccaaaaatgcaaaaaattcctccgaatcaca
aaatataaaatccaacacaccaataaagccccgaaggaaactggtgctgctgtaaaagcaccacaataaggatgctgcacatcgcaacaatggtttcacgagggaacgcggcgcagccca
ggctattattctcggaaacttccgcgttcggacggcggcgttgcgacgggaaaggtgggtgcgcaaatatccaggggtgcaccgacgctgagctcaattcggcctatagtgtgctattaca
attcactggcgtctttacaacgctgactgggaaacccctggcgttaccacaattaatgccttgcagcacatcccccttccgacgctggcgtataagcgaagggcccccaccgacggcc
ttccaacagttgcgacgctgaatggcgaatgggacgcccctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtggtggtggttacgagcgtgaccgctacttccagcggcctagcggccgc
tccttgccttctcccttcttctcggcagctcggcggcttccccgtaagcttaaatcggggctcccttaggggttccgalltagtcttacggcactcgaaccccaaaaacttgattagggt
gatggttcagtagtggccatcggcctgatagacggttttccgcttgcggtggagtcacgcttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaacactaacctctctcgtctattctttg
attataagggtttgcccattcggcctattggttaaaaatgagctgatttaacaaaatftaacgcaattttaacaaaatattaacgcttacaatttaggtg

- b) Origen y función específica de cada parte del inserto:
 - En el caso del objetivo 1 no se añade ningún inserto.
 - Para el objetivo 2 los insertos se obtuvieron de los plásmidos pCDNA3-TS y pCDNA3-ΔTS encargados a la casa comercial Genscript y sintetizados artificialmente por ellos en base a las secuencias codificantes de las TS que les proporcionamos.
- c) Descripción del método utilizado para la transformación: Electroporación.
- d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto:
 - En el caso del objetivo 1 no se añade ningún inserto.
 - Para el objetivo 2 las TS son proteínas con actividad enzimática, adquieren ácido siálico de las proteínas del huésped y las incorporan a las proteínas del parásito.
- e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto: No procede.
- f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente? Sí.
- g) ¿Contiene secuencias que no son necesarias para la función deseada? En caso afirmativo, especifíquese. No.
- h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese. No.



VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre? Puede quedar como episoma.

En caso afirmativo:

i) Número de copias: Variable.

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido? Sí.

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?: Sí.

En caso afirmativo:

i) número de copias: Variable.

ii) localización cromosómica: junto a rRNAs.

iii) secuencias colindantes: rRNAs.

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

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

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)

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:
 - 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: No.
 - b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese: No.
 - c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar: No sabemos aún.
 - d) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese: No.
 - e) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese: No.
 - f) Marcadores específicos del OMG: marcadores Luc y/o NeoGreen dependiendo de la cepa transgénica, y el gen de resistencia a higromicina.

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

- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos: No.

- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
 - a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: Análisis por PCR y detección de la fluorescencia y/o bioluminiscencia.
 - b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente: los OMGs no van a ser liberados al 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: Los parásitos se encuentran al inicio del proyecto en su forma replicativa no infectiva epimastigote, por lo que el primer paso es diferenciarlos a la forma infectiva no replicativa tripomastigote mediante la utilización de un medio especial de diferenciación. Una vez obtenida la forma infectiva tripomastigote, se amplificarán mediante el co-cultivo con células de la línea celular Vero (derivada de riñón de mono verde) obteniéndose los tripomastigotes necesarios para los experimentos.

Para experimentos *in vitro*, utilizaremos una multiplicidad de infección máxima de 10 a 1. Haremos como máximo 40 experimentos utilizando varias condiciones a determinar utilizando un total de 2×10^8 células huésped, por lo que utilizaremos como máximo 2×10^9 tripomastigotes de *T. cruzi*.

Para experimentos *in vivo* en ratones, a partir de los tripomastigotes del co-cultivo con células Vero inocularemos 2 ratones BALB/c o 2 ratones deficientes en la expresión del receptor de Interferón Gamma (*Ifng*^{-/-}) (<https://www.jax.org/strain/003288>) con 5×10^3 tripomastigotes antes de cada experimento. A los 7 días post infección, se extraerá la sangre y se utilizarán los tripomastigotes sanguíneos para infectar los ratones de cada experimento. Haremos como máximo 16 experimentos utilizando 10 ratones (160 ratones en total) infectándolos como máximo con de 10^4 tripomastigotes sanguíneos, por lo que como máximo utilizaremos $1,6 \times 10^6$ tripomastigotes sanguíneos.

- b) Número de plantas:
- c) Número de animales: ver apartado VII. 2.a)

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada: Hasta el 30 de septiembre del 2025 de momento (tiempo duración del proyecto)

(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:
Descubrir nuevos factores de virulencia y/o dianas terapéuticas.
- 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:
Procede del London School of Hygiene and Tropical Medicine (London, UK).
- 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*):
El transporte se realizará a través de la empresa World Courier que tiene extensa experiencia en este tipo de envíos y conoce la legislación aplicable y estamos solicitando el permiso de importación ocasional al Ministerio de Sanidad.
- 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 epimastigotes replicativos no infectivos se cultivarán *in vitro* a 27-28°C en frascos de 20-75 mL conteniendo medio RPMI-Hepes. Los epimastigotes se diferenciarán a tripomastigotes infectivos, no replicativos cultivándolos en medio Grace. Para obtener los suficientes tripomastigotes infectivos para experimentos *in vitro*, se co-cultivarán con células Vero. Para experimentos *in vivo*, se infectarán ratones con los tripomastigotes del co-cultivo con células Vero para obtener tripomastigotes sanguíneos.
- 8) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse:
Los requeridos para NBC3, equipos de protección personal de un solo uso, aunque no es necesario para la experimentación con *T. cruzi*, en determinadas ocasiones se utiliza capuz con filtro de aire motorizado ya que en la instalación se trabaja con virus respiratorios que se transmiten por aerosoles, detectores de verticalidad, y alarmas conectadas con recepción del CBMSO.

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/>



VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El CBMSO se encuentra ubicado en una zona del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid que se caracteriza por la amplitud que existe entre los diferentes edificios.

No existen zonas residenciales cercanas, ni zonas de cultivos, explotaciones ganaderas, cotos y reservas de caza. Tampoco zonas naturales protegidas ni de interés ecológico.

El laboratorio con nivel de contención 3 de cultivos celulares está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios que marca la normativa, tanto para las manipulaciones a realizar como en el tratamiento específico de los residuos generados sólidos y líquidos. Estos medios e infraestructuras se validan periódicamente.

La estancia dispone de normas específicas de manipulación que están incluidas en el reglamento de funcionamiento y en los Manuales de Bioseguridad donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, conocidos y al alcance de todos los usuarios. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMGs, limpieza y desinfección de zonas y materiales, esterilización e inactivación se encuentran protocolizados por escrito.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes: Clima continental-mediterráneo con primavera y otoños húmedos e inviernos y veranos secos y un fuerte gradiente de temperaturas estacional.

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:

Laboratorios BSL3 de cultivos celulares y animalario del CBMSO, CSIC-UAM. (A/ES/17/I/22 y A/ES/17/I/23).



Los residuos líquidos son inactivados por calor en el sistema de tratamiento de efluentes líquidos del que dispone la instalación. (Biowaste).

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Siguiendo las Normas de trabajo establecidas y teniendo en cuenta el nivel de contención de la Instalación, es difícil que se produjera un accidente. En el manual de Bioseguridad están contemplados los pasos a seguir en caso de incidente o accidente y serán conocidos éstos por todos los usuarios.

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Sensores de verticalidad, equipos de protección individual de un solo uso, mascarilla FFP2 con válvula, capuz, respirador motorizado, guantes, manejo del patógeno en cabinas BSL3, jaulas de ratones conectadas a circuito de aire filtrado (racks ventilados), desinfección externa de jaulas de ratones, frascos cultivos y tubos que contengan parásitos con Perasafe previa al traslado de los mismos fuera de la cabina BSL3.

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

Formación a cargo del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales del CBMSO, de los responsables de las instalaciones BSL3, y de los miembros del equipo de trabajo del proyecto.

4) Planes de emergencia:

En el caso de vertidos accidentales de *T. cruzi* desinfección inmediata con Perasafe.



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

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

- 1) Entidad
Nombre: CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CSIC-UAM)
Dirección postal: C/ NICOLAS CABRERA 1, 28049 MADRID

- 2) Representante legal de la entidad
Nombre y apellidos: LOURDES RUIZ DESVIAT
NIF: 05253811J
Cargo: DIRECTORA
Tel: 911964424
Fax:
Correo electrónico: direccion@cbm.csic.es

- 3) Responsable científico de la actividad
Nombre y apellidos: NÚRIA GIRONÈS PUJOL
NIF: 46327626Z
Cargo: PROFESORA TITULAR
Tel: +34 911964593
Fax:
Correo electrónico: ngirones@cbm.csic.es

- 4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
Nombre y apellidos: GEMA CAPARRÓS DE LA JARA
NIF: 05432793D
Cargo: RESPONSABLE DE BIOSEGURIDAD
Tel: 911964537
Fax:
Correo electrónico: gcaparros@cbm.csic.es

- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto

NÚRIA GIRONÈS PUJOL



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:

Son 2 los objetivos de la actividad con *T. cruzi* modificado genéticamente.

- a) Por un lado, detectaremos el parásito mediante fluorescencia y/o bioluminiscencia, lo que permitirá cuantificar la carga parasitaria, ver en que compartimentos celulares se localiza el parásito en cada momento en cultivos celulares mediante microscopía de fluorescencia.

Por otro lado, localizaremos el parásito en modelos experimentales de ratón mediante la utilización de imagen in vivo, lo que permite reducir el número de animales de experimentación (regla RRR).

- b) Investigar la función de una Transialidasa (TS) del parásito en el proceso infectivo in vitro e in vivo. La TS es miembro de la gran familia multigénica de las TSs implicadas en el proceso de infección. Postulamos que interacciona con el receptor SLAMF1 de la célula huésped interacciona facilitando la infección, por lo que podría ser un factor de virulencia y/o una diana terapéutica.

2) Duración prevista de la actividad: Hasta el 30 de septiembre 2025, final del proyecto actual

(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. Afectaciones cardíacas y/o digestivas. Con menor frecuencia afecciones neurológicas.
- b) Organismo donante. Ninguna.
- c) Inserto. No se han descrito.



- d) Vector. Ninguna
- e) Organismo modificado genéticamente resultante. Las mismas que el organismo receptor. Los problemas de salud ya mencionados en el apartado a)
- f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal. Los problemas de salud ya mencionados en el apartado a).
- g) Efectos para el medio ambiente. Ninguno.

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).

Todas las actividades se realizan en los laboratorios nivel de contención biológica 3 por lo que es improbable que se libere al medio ambiente y la exposición humana en prácticamente nula debido a las características de las instalaciones descritas más adelante, y los equipos de protección individual que incluye capuz con ventilación motorizada. También los protocolos que se siguen minimizan la exposición humana a *T. cruzi* proveniente de los cultivos celulares y los animales de experimentación.

- b) Concentración y escala utilizadas.

Muy baja dado que para experimentos *in vitro*, utilizaremos una multiplicidad de infección máxima de 10 a 1. Haremos como máximo 40 experimentos utilizando varias condiciones a determinar utilizando un total de 2×10^8 células huésped, por lo que utilizaremos como máximo 2×10^9 tripomastigotes de *T. cruzi*.

Para experimentos *in vivo* en ratones, a partir de los tripomastigotes del co-cultivo con células Vero inocularemos 2 ratones BALB/c o 2 ratones deficientes en la expresión del receptor de Interferón Gamma (*Ifng*^{-/-}) (<https://www.jax.org/strain/003288>) con 5×10^3 tripomastigotes antes de cada experimento. A los 7 días post infección, se extraerá la sangre y se utilizarán los tripomastigotes sanguíneos para infectar los ratones de cada experimento. Haremos como máximo 16 experimentos utilizando 10 ratones (160 ratones en total)



infectándolos como máximo con de 10^4 tripomastigotes sanguíneos, por lo que como máximo utilizaremos $1,6 \times 10^6$ tripomastigotes sanguíneos.

- 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).

Se realiza en instalaciones de nivel de Bioseguridad tipo 3 (BSL3), nivel de confinamiento impide su propagación al entorno y el insecto vector responsable de la infección natural no se encuentra en España, por lo que no hay posibilidad de exposición humana y ambiental, salvo en caso de accidentes de laboratorio.

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

La actividad se clasifica como de nivel 3. El laboratorio de cultivos está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, tanto para las manipulaciones a realizar como en el tratamiento de residuos generados.

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

Es improbable que se produzca una liberación accidental en nivel 3 donde los ratones pueden estar infectados experimentalmente, ya que en este nivel 3 todos los ratones se sacrifican al final del experimento. En ambos casos consideramos que el riesgo es bajo.

(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.)

Los OMG se manipularán en el área de contención de nivel 3 del animalario y cultivos del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), que cuenta con todas las garantías de confinamiento para este tipo de estudios.

El CBMSO se encuentra ubicado en una zona del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid que se caracteriza por la amplitud que existe entre los diferentes edificios.

No existen zonas residenciales cercanas, ni zonas de cultivos, explotaciones ganaderas, cotos y reservas de caza. Tampoco zonas naturales protegidas ni de interés ecológico.

El laboratorio con nivel de contención 3 de cultivos celulares está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios que marca la normativa, tanto para las manipulaciones a realizar como en el tratamiento específico de los residuos generados sólidos y líquidos. Estos medios e infraestructuras se validan periódicamente.

La estancia dispone de normas específicas de manipulación que están incluidas en el reglamento de funcionamiento y en los Manuales de Bioseguridad donde se



especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, conocidos y al alcance de todos los usuarios. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMGs, limpieza y desinfección de zonas y materiales, esterilización e inactivación se encuentran protocolizados por escrito.

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

Siguiendo las Normas de trabajo establecidas y teniendo en cuenta el nivel de contención de la Instalación, es difícil que se produjera un accidente.

En el Plan de Autoprotección vienen indicadas y se indicaron en el apartado VI de la solicitud de autorización de las dos instalaciones.

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

Los requeridos para NBS3, equipos de protección personal de un solo uso, aunque no es necesario para la experimentación con *T. cruzi*, en determinadas ocasiones se utiliza capuz con filtro de aire motorizado ya que en la instalación se trabaja con virus respiratorios que se transmiten por aerosoles, sensores de verticalidad, y alarmas conectadas con recepción del CBMSO.

- d) Planes de emergencia.

Incluidos en el plan de Autoprotección del edificio e incluidos en la memoria de notificación de la Instalación. Conocidos por el personal usuario del laboratorio.