



**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: **Enrique Martín Gayo**

NIF: **51985027J**

Cargo: **Investigador Ramón y Cajal, Universidad Autónoma de Madrid**

Tel: **915202307**

Fax: **915202374**

Correo electrónico: **enrique.martin@uam.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:

ENRIQUE MARTÍN-GAYO Y GEMA CAPARRÓS



- 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:

Los experimentos con los ratones humanizados BLT en los cuáles se llevará a cabo la actividad son financiados por otra institución

- 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: [Animalario 06/11/2017 y cuarto de cultivos P3 27/07/2017](#)
- b) Número de referencia del expediente: [Animalario A/ES/17/I-23 7 y Cultivos A/ES/17/I-22 para procesar los tejidos de los animales ya sacrificados.](#)

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

- 1) Finalidad de la actividad:

Actualmente, no existe una vacuna preventiva ni una cura contra la infección por VIH, que continúa causando una pandemia global. Por tanto, es necesario desarrollar nuevas estrategias para maximizar la inmunidad contra este virus y proteger a la población. En este sentido, una mejor comprensión de las respuestas inmunitarias dinámicas que tienen lugar en distintos lugares clave de replicación viral *in vivo* tales como el tejido linfoide, el intestino o las mucosas es clave para poder diseñar nuevas terapias más eficaces contra el virus. Afortunadamente, los modelos de ratones humanizados se consideran el mejor modelo *in vivo* de infección por VIH y son extremadamente útiles, ya que permiten estudiar algunos aspectos críticos de la infección por VIH, tales como la depleción de linfocitos T CD4+ en sangre, la respuesta a terapia antiretroviral reduciendo la carga viral y facilitando el estudio de los reservorios virales.

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.



Entre los distintos modelos de ratón humanizado, destaca el modelo BLT que se origina de la línea madre de ratones NOD/SCID/IL2R γ c-deficientes (NSG) trasplantándolos con precursores hematopoyéticos y tejido humano. Es importante destacar que el xenotransplante no introduce ninguna modificación genética adicional en estos animales. Estos ratones humanizados han sido ya utilizados como modelos de infección por VIH en múltiples estudios en publicaciones reconocidas por el campo (J Immunol 2009, Brainard DM et al; Metcalf Pate KA et al, J Infect Dis 2015; Flerin NC et al, 2019). En el caso del proyecto presentado, los ratones BLT serán generados por colaborador en USA. Para ello, los colaboradores compran los ratones NSG directamente de Laboratorios Jackson por los colaboradores, y generan el modelo ya humanizado BLT trasplantando el tejido y precursores hematopoyéticos obtenido por ellos localmente, todo ello de acuerdo al protocolo ya aprobado por el Comité de Ética de su institución.

Durante la actividad no manipularán muestras de tejido humano y no se generará el modelo animal. Los ratones serán enviados ya humanizados a Madrid y la actividad que realizará será la infección intravaginal con un aislado primario de VIH y su posterior análisis y sacrificio.

La necesidad de la actividad confinada se justifica por la infección de ratones humanizados BLT con virus VIH. La finalidad de estos modelos es estudiar las dinámicas de poblaciones inmunitarias en el tejido durante la infección por VIH, tales como los linfocitos T, las células NK y las células dendríticas y los mecanismos de persistencia *in vivo* de células T CD4⁺ latentemente infectadas por VIH en distintos órganos, utilizando como modelo estos animales que serán puestos en tratamiento antiretroviral tras la infección por VIH-1, y en los cuáles testaremos el impacto de inmunoterapias combinadas utilizando células dendríticas activadas con Poly I:C y ligandos de STING, junto con anticuerpos bloqueantes o ligandos recombinantes dirigidos a receptores inmunomoduladores “checkpoint” como el PD-1, TIGIT y el TIM3, o moduladores del metabolismo como la Metformina, potenciando la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8⁺ y células NK y reduciendo la persistencia de célula infectadas en esos nichos anatómicos. Los candidatos para potenciar inmunoterapias han sido previamente seleccionados en ensayos *in vitro*, y esperamos validar *in vivo* su potencial terapéutico y encontrar diferencias en la detección y distribución de células infectadas por VIH en el tejido linfoide como el bazo de lo ratones humanizados BLT. En el modelo BLT también esperamos poder potenciar la reducción del reservorio viral y un menor repunte de la carga viral en plasma al retirar el tratamiento antiretroviral tras la inmunoterapia.

El OMG (ratones NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) o ratones NSG, NOD-scid IL2Rgammanull, NOD-scid IL2Rgnull, NOD scid gamma.

Los ratones NSG dobles mutantes se produjeron cruzando hembras de ratones NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J con ratones macho portadores del alelo B6.129S4-Il2rg^{tm1Wjl}/J ligado al cromosoma X

Los ratones BLT son ratones NSG humanizados (La humanización no origina modificación genética).

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

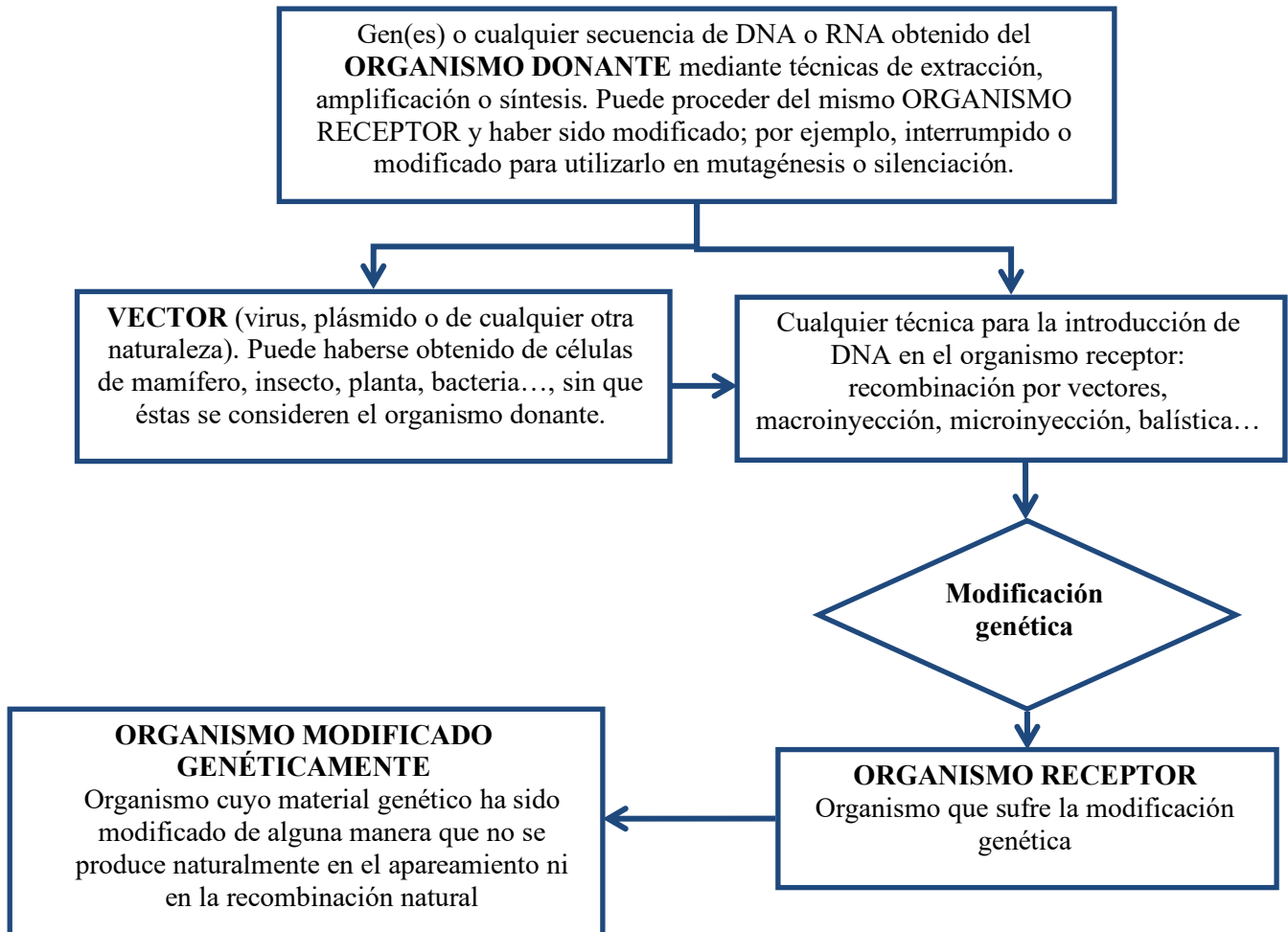


Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente, y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las Notas de orientación para la evaluación del riesgo).

- 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:

Ratones NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J se obtienen a partir de ratones BALB/c-Igh^b (C.B-17). <https://www.jax.org/strain/001303>

Ratones B6.129S4-II2rg^{tm1Wjl}/J se obtienen a partir de ratones 129S4/SvJaeJ. <https://www.jax.org/strain/003174>

Taxonomía: *Mus musculus*

Nombre común: Ratones

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

b) Técnicas de identificación:

c) Marcadores genéticos:

C.B-17, lleva el repertorio de cadenas pesadas de inmunoglobulinas (*Igh^b*) de ratones C57BL/Ka

129S4/SvJaeJ presenta una delección espontánea en el gen *Disc1*

d) Marcadores fenotípicos:

e) Estabilidad genética:

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

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:

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?



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

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*):
 - b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:
- 11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:
- 12) Hábitat natural del organismo:



IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: *Se utilizó un casete de resistencia a la neomicina para interrumpir parte del exón 3 y todos los exones del 4 al 8 del gen Il2rg.* <https://www.jax.org/strain/003174>

Taxonomía:

Nombre común:

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

3) Método de obtención:

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in Vitro*

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

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?

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

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

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

Información disponible en la página web <https://www.jax.org/strain/005557>

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: **cambio de bases**

2) Finalidad de la modificación genética:

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

La línea NSG se genera a través del cruce de ratones hembras NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J y ratones machos portadores del alel B6.129S4-II2rg^{tm1Wjl}/J. (<https://www.jax.org/strain/005557>) ligado al cromosoma X.

-La mutación puntual espontánea PrKdc^{scid} producida por un cambio de Adenina a Timidina en el codón 4046 (codón 4095 en el transcrito ENSMUST00000023352.8) creando un codón de parada prematura (p.Y4046). (<http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:1857113#MutationOrigin>). Como resultado estos ratones son deficientes en linfocitos T y B

-La mutación del gen de la cadena gamma de la IL-2 se lleva a cabo a través de la inserción de un casete con resistencia a neomicina que reemplaza parte del exón 3y exones 4-8, dan lugar a la pérdida de la mayoría del dominio extracelular y toda la parte transmembrana y citoplasmática de la proteína. (<http://www.informatics.jax.org/allele/MGI:1857455>). La consecuencia es la pérdida de células NK en estos animales.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

b) Si se trata de un virus:

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*):

d) Gama de hospedadores del vector:

e) Características de la movilidad del vector:

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?

5) Información del inserto: **No aplica**

- 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**

Información disponible en la página web <https://www.jax.org/strain/005557>

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?:

En caso afirmativo:

i) número de copias:

ii) localización cromosómica:

iii) secuencias colindantes

iv) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?:

c) Si se trata de 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*):
 - 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: **Sí, la línea NSG antes de ser humanizada presenta una inmunodeficiencia severa que le hace muy susceptible a infecciones con cualquier microorganismo, de modo que debe ser manipulada en zona limpia para evitar que enfermen y mueran.**

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:

La línea de ratones NSG no es patogénica para el hombre hasta el momento de ser humanizado con células humanas, en cuyo caso podrían actuar como vector de patógenos humanos por lo que se consideran de riesgo 2.

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

No, al contrario, debido a su inmunodeficiencia, la línea NSG no puede sobrevivir ni causar daño al medio ambiente.

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

Al tratarse de animales inmunodeficientes, requieren que el pienso y el agua sean autoclavadas.

f) Marcadores específicos del OMG:

3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*): **Es una línea estable (<https://www.jax.org/strain/005557>)**



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

No aplica

5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:

a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: Ausencia de linfocitos T, B y células NK en sangre y en tejidos.

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

No aplica

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: No aplica

b) Número de plantas: No aplica

c) Número de animales: Hemos calculado un mínimo de 102 animales BLT para los experimentos de vacunas y terapias celulares contra VIH.

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

(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 asociadas las actividades con los OMG).

Se solicita permiso para llevar a cabo varios estudios en estos modelos, por lo que se estima una duración aproximada de 5 años.

4) Finalidad de la actividad de utilización confinada, incluidos los resultados esperados:

La necesidad de la actividad confinada se justifica por la infección de ratones humanizados BLT con virus VIH. La finalidad de estos modelos es estudiar las dinámicas de poblaciones inmunitarias en el tejido durante la infección por VIH, los mecanismos de persistencia *in vivo* de esas células en distintos órganos tras el inicio de terapia antiretroviral, el impacto de tratamiento y de inmunoterapias basadas en células innatas y combinadas con el bloqueo de receptores inmunomoduladores “checkpoint” potenciando la respuesta inmunitaria o



reduciendo la persistencia viral en esos nichos anatómicos. Esperamos encontrar diferencias en la detección y distribución de células infectadas por VIH en el tejido linfóide de los ratones humanizados BLT que reciban inmunoterapias validadas en estudios *in vitro*. En el modelo BLT también esperamos poder potenciar la reducción del reservorio viral y un menor repunte de la carga viral en plasma al retirar el tratamiento antiretroviral tras la inmunoterapia.

- 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:

Los ratones parentales NSG (Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ), proceden de Jackson Laboratory y los ratones humanizados BLT basados en esa línea parental serán obtenidos por los colaboradores en USA, con la aprobación del Comité de ética Animal de la Institución.

- 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*):

Para los ratones NSG-BLT humanizados procedentes de USA: el tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación y etiquetado seguirán la legislación internacional y nacional vigente para el transporte de material biológico infeccioso para humanos y animales.

- 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*):

El manejo de los animales OMG BLT y la infección con VIH se llevará a cabo en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica. Las infecciones se llevarán a cabo en cabinas de seguridad biológica de flujo laminar (clase II). Se utilizarán cepos para la extracción de sangre y el tejido obtenido de los animales, el cultivo o aislamiento de las células se realizará en la sala de cultivos, incubadores y cabinas de nivel 3 de bioseguridad.

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

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/>



Todas las manipulaciones se realizarán en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica (NCB3), en las cabinas de seguridad biológica (clase II) y el alojamiento de los ratones será en los racks ventilados. Se utilizarán equipos de protección individual. Todos los residuos biosanitarios generados se inactivarán en un primer paso en el interior de la cabina de bioseguridad clase IIA. Posteriormente volverán a ser inactivados mediante autoclave (residuos sólidos) o en la planta de inactivación de efluentes líquidos del laboratorio (residuos líquidos).

En el manual de Bioseguridad del laboratorio de cultivos P3 y del Animalario están indicadas todas las normas a realizar.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

- 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales: El riesgo de contaminación ambiental en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al CBMSO es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

El centro 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.

Los laboratorios con nivel de contención 3 de cultivos celulares y del animalario están equipados con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, tanto para las manipulaciones a realizar como en el tratamiento específico de los residuos generados tanto sólidos como líquidos. Estos medios e infraestructuras se validan periódicamente.

Ambas estancias disponen 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 OMG, 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:

La experimentación se realizará en los laboratorios de cultivos y Animalario con nivel de contención 3 que fueron dadas de alta para estas actividades en el año 2017.

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



1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Recogidos en el Plan de Emergencia, incluido en el apartado VI de las solicitudes de autorización tanto del laboratorio de Cultivos como del laboratorio del Animalario (A/ES/17/I-22 Y A/ES/17/I-23). Las muestras de ratones ya sacrificados se comunicarán entre ambas instalaciones contiguas a través de un SAS, en contenedores cerrados y adecuados para ello.

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Recogidos en el Plan de Emergencia, incluido en el apartado VI de las solicitudes de autorización tanto del Animalario P3 como el laboratorio de Cultivos P3 (A/ES/17/I-22 Y A/ES/17/I-23). Las muestras de ratones ya sacrificados se comunicarán entre ambas instalaciones contiguas a través de un SAS, en contenedores cerrados y adecuados para ello.

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

Los Manuales de Bioseguridad de ambos laboratorios están disponibles en formato papel y en la web del CBMSO para todos los usuarios de dichos laboratorios.

Recibirán siempre un seminario con parte teórica y práctica previo a la utilización del laboratorio.

4) Planes de emergencia:

Incluidos en la memoria de notificación para la autorización de los laboratorios.



**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: **Enrique Martín Gayo**
NIF: **51985027J**
Cargo: **Investigador Ramón y Cajal, Universidad Autónoma de Madrid**
Tel: **915202307**
Fax: **915202374**
Correo electrónico: **enrique.martin@uam.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

ENRIQUE MARTÍN-GAYO Y GEMA CAPARRÓS



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:

Se solicita autorización para la utilización de modelos animales humanizados de infección por VIH para el estudio de nuevas vacunas y terapias celulares en estos animales, y para comprender mejor las dinámicas de replicación viral en distintos tejidos y cómo se ven afectadas por la respuesta del Sistema Inmunitario. Para ello, utilizaremos el modelo de ratones humanizado, BLT, generado a partir de la línea NSG, que es un modelo animal modificado genéticamente. con precursores hematopoyéticos CD34+ y tejido humano, y enviados a España para infectarles con VIH y estudiar la dinámica de replicación viral y la vacunación/terapias en presencia y ausencia de tratamiento antiretroviral.

La humanización no produce modificación genética

2) Duración prevista de la actividad:

(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).

Los experimentos se realizarán en el contexto de un proyecto competitivo financiado que finalizará en 2024 y otro nuevo proyecto solicitado que previsiblemente finalizará en 3 años. Por tanto, se solicita una duración mínima de 5 años para llevar a cabo estos estudios utilizando estos modelos de infección por VIH en ratón modificado genéticamente humanizado.

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.

Ratones NOD.CB17-Prkdcscid/J se obtienen a partir de ratones BALB/c-Ighb (C.B-17). <https://www.jax.org/strain/001303>

Ratones B6.129S4-Il2rgtm1Wjl/J se obtienen a partir de ratones 129S4/SvJaeJ. <https://www.jax.org/strain/003174>

b) Organismo donante.



- c) Inserto.
Se utilizó un casete de resistencia a la neomicina para interrumpir parte del exón 3 y todos los exones del 4 al 8 del gen Il2rg. <https://www.jax.org/strain/003174>
- d) Vector.
- e) Organismo modificado genéticamente resultante.
El OMG (ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rgtm1Wjl/SzJ) o ratones NSG, NOD-scid IL2Rgammanull, NOD-scid IL2Rgnull, NOD scid gamma
Los ratones BLT son ratones NSG humanizados (La humanización no origina modificación genética).
- f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.
Los modelos humanizados basados en ratones NSG y NSG-BLT se consideran riesgo de tipo 2 desde el momento que contengan células humanas al poder potencialmente ser vectores de enfermedad. Como se ha dicho, una vez que se trasplanten con células de pacientes VIH o se infecten ratones BLT con VIH, existirá un riesgo adicional que requiere un nivel de contención 3.
- g) Efectos para el medio ambiente.
No tienen efectos nocivos para el medio ambiente

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).
Los experimentos con animales NSG humanizados para infecciones con VIH requieren por el uso de un agente infeccioso peligroso para los seres humanos, la utilización de un nivel de contención 3.
- b) Concentración y escala utilizadas.
No aplica



- 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 aplica

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

Sólo se utilizará cultivos con nivel de contención P3 (A/ES/17/I-23) para el procesamiento de los órganos de los ratones NSG-BLT infectados con VIH, contigua al animalario A/ES/17/I-23 y comunicado a través de un SAS. Las muestras serán trasladadas en contenedores cerrados y adecuados para ello, para así procesar las células e inactivar el virus con Paraformaldehído 4% para el análisis de las muestras.

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

Al tratarse de OMG inmunodeficientes y que recibirán un xenotrasplante con células humanas, no se producirá un riesgo para el ambiente, podría potencialmente suponer un riesgo para la salud de otras personas

(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 humanizados se manipularán en un área de contención de nivel 3 del animalario del Centro, que cuenta con todas las garantías de aislamiento de fuentes de peligro adecuadas para este tipo de estudios, tales como duchas en el acceso y salida, y trajes de aislamiento, cabinas de flujo laminar y áreas de cultivo en la zona de bioseguridad P3 para la manipulación de células infectadas por VIH.

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

Si se produjese una rotura del traje de protección y una herida abierta con sangrado producida por mordedura de los OMG una vez ya infectados por VIH.

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

No se requiere un aislamiento de la ventilación dado que nuestros modelos OMG serán infectados por VIH, que no se extiende por medio aéreo. Sin embargo, de producirse una fuga de los racks ventilados o de la zona de manipulación, se procedería al cierre y sellado hasta la captura del animal.

- d) Planes de emergencia.

Si se produjese un accidente con mordedura de animales OMG infectados con VIH, se procedería al traslado a Urgencias del Hospital más cercano y al inicio de la Profilaxis Post-exposición, de acuerdo a los protocolos establecidos de exposición a muestras infecciosas por VIH.