



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

Nº de Registro:	Nº de Notificación:
------------------------	----------------------------

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: [Centro Nacional de Biotecnología \(CSIC\)](#)
Dirección postal: [c/ Darwin 3](#)
[28049 - Madrid](#)

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: [Fernando Rojo de Castro](#)
NIF: [50295113-R](#)
Cargo: [Director del CNB](#)
Tel: [91 585 45 03](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: direccion@cnb.csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: [Urtzi Garaigorta de Dios](#)
NIF: [20223585-F](#)
Cargo: [Investigador Contratado](#)
Tel: [91 585 45 33](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: ugaraigorta@cnb.csic.es

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

Nombre y apellidos: [Fernando Usera Mena](#)
NIF: [00694865-N](#)
Cargo: [Responsable del Servicio de Seguridad Biológica y Protección Radiológica](#)
Tel: [91 585 45 41](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es



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

Fernando Usera Mena

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

SI NO

- 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: 7/03/2001

b) Número de referencia del expediente: A/ES(00/I-8)

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

- 1) Finalidad de la actividad:

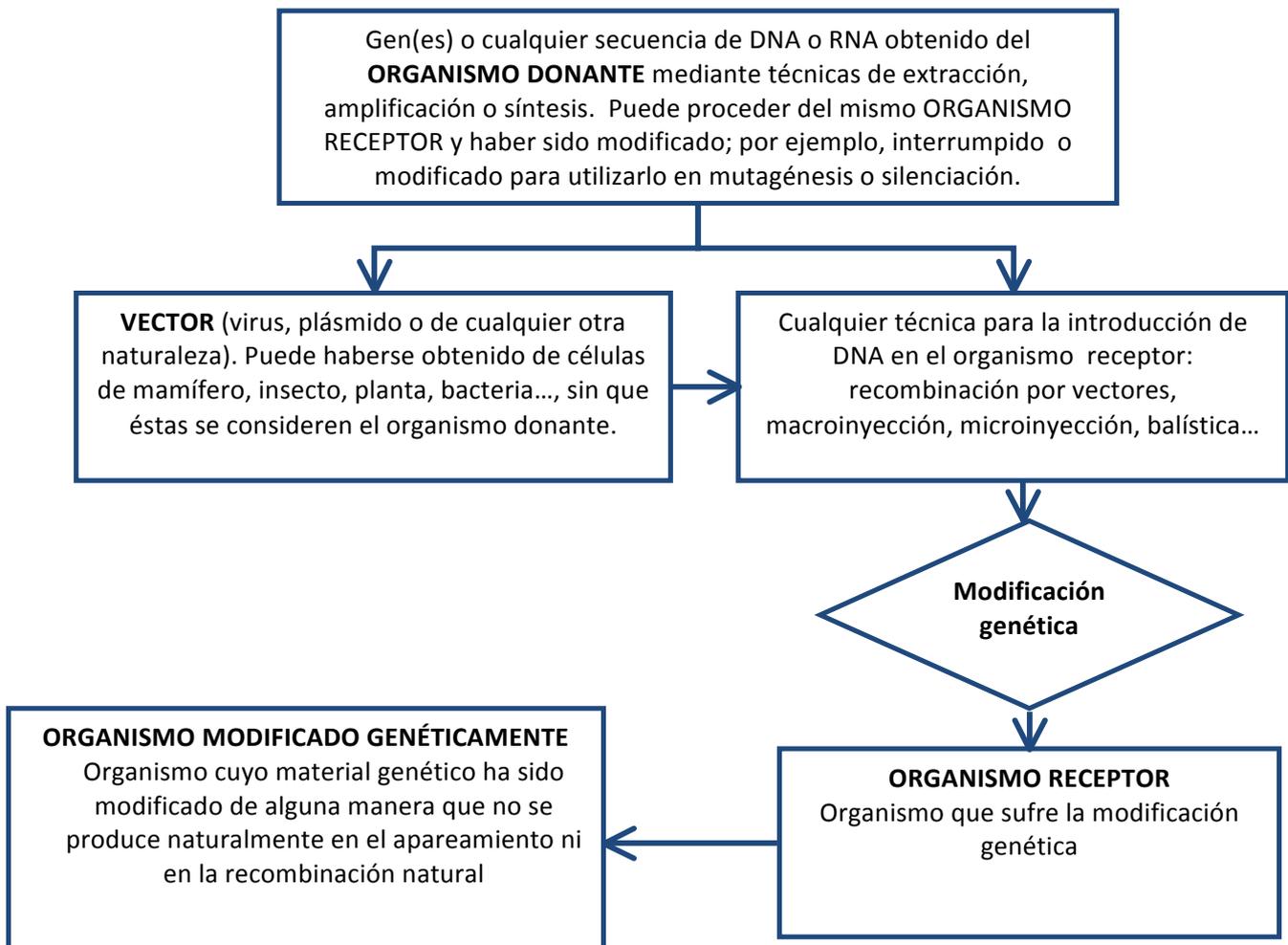
Estudio de los factores celulares y virales que regulan la infección del virus de la hepatitis B (HBV) utilizando para ello un sistema in vitro de infección de células en cultivo.

- 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: **HepG2**
Taxonomía: **Homo Sapiens**
Nombre común: **Hepatoblastoma humano**
- 2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.
 - a) Técnicas de aislamiento:
Cirugía, preparación de suspensión unicelular y cultivo en medios de composición conocida.
 - b) Técnicas de identificación:
Células humanas. Identificación por secuenciación de genes, western-blot de proteínas humanas e inmunofluorescencia.
 - c) Marcadores genéticos:
Genes humanos.
 - d) Marcadores fenotípicos:
Proliferación en medio de cultivo, crecimiento sin inhibición por contacto.
 - e) Estabilidad genética:
Desconocida. Se asume típica de líneas tumorales en cultivo.
- 3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:
Transformación tumoral en el paciente.
- 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 aplica
- 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 aplica, aunque el material de origen humano se asimila al grupo de riesgo 2 de patógenos humanos ya que existe una baja probabilidad de que se pueda contaminar por patógenos humanos
 - a) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?
No aplica



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

No aplica

SI NO

Porqué:

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

Sí, está libre de agentes biológicos contaminantes. Esta línea celular se ha obtenido de la American Type Culture Collection (ATCC), nº de catálogo HB-8065.

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

Se trata de una línea celular estándar que cientos de laboratorios a nivel mundial llevan caracterizando desde hace años. Particularmente, se dispone de amplia experiencia con su interacción con el organismo donante.

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

No aplica

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

No aplica

d) Posibles nichos ecológicos:

No aplica

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

No aplica

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

No aplica



b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

No aplica

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

No aplica

12) Hábitat natural del organismo:

No aplica

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: **Virus de la Hepatitis B**

Taxonomía: Familia: **Hepadnaviridae**, género **orthohepadnavirus**

Nombre común: **HBV**

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

Genoma completo

3) Método de obtención:

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in vitro*

4) Función del gen/genes en el organismo donante

Debido a que se ha clonado la secuencia completa del genoma del virus la construcción resultante da lugar a la expresión de todos los genes virales y a la producción del virus infeccioso en su totalidad.

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 que modo se manifiesta la patogenicidad?

La infección por el virus HBV produce hepatitis (aguda y crónica), fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma.



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

Sí, se trata del genoma completo.

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

Sí. El HBV tiene la capacidad de insertarse en los cromosomas de las hepatocitos infectados en los pacientes que han desarrollado una infección crónica. Se ha descrito una asociación entre el desarrollo de hepatocarcinoma y la presencia de formas virales integradas en los hepatocitos infectados aunque la relación causa/efecto de dicha asociación no está demostrada.

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| a) Inserción de material genético | <input checked="" type="checkbox"/> |
| b) Deleción de material genético | <input type="checkbox"/> |
| c) Sustitución de bases | <input type="checkbox"/> |
| d) Fusión celular | <input type="checkbox"/> |
| e) Otros, especifíquese | |

2) Finalidad de la modificación genética:

Generación de líneas celulares hepáticas que producen y secretan HBV en el sobrenadante tanto de manera constitutiva (caso de las células HepG2.2.15 resultantes) como inducible (caso de las células HepAD38 resultantes). Esto permite tener acceso ilimitado al virus HBV, que de manera natural se propaga muy poco eficientemente en cultivos celulares.

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

Amplificación de las secuencias virales a través de PCR, clonaje de dichas secuencias en plásmidos bacterianos y posterior transfección y selección de los clones resistentes.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a. Tipo e identidad del vector:

Plásmidos bacterianos. Se identifican en los siguientes apartados

b. Si se trata de un virus:

No aplica.

Es defectivo en replicación SÍ NO

No aplica

- 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):

El vector plasmídico usado para generar las células HepG2.2.15 es el pDolTHBV-1. Este vector es la consecuencia del clonaje de dos dímeros del genoma de HBV en el vector pDolmp10 que a su vez contiene las secuencias retrovirales LTR, la región *psi* y una porción pequeña de la proteína de la envuelta *env* del virus Moloney murine leukemia virus (MoMLV). Además, el vector contiene el gen de resistencia a neomicina que le confiere una ventaja durante la selección con G418 permitiendo la generación de clones resistentes a la selección. No se aporta el mapa de restricción del vector por no tener acceso al mismo ya que la descripción de la generación del vector no es lo suficientemente detallada en la bibliografía no permitiendo una reconstrucción veraz *in silico*. La estrategia y descripción básicas del vector utilizado para el clonaje de las secuencias de HBV (dos dímeros en orientación cabeza-cola) se puede encontrar en la siguiente referencia bibliográfica: Sells et al. PNAS 1987, PMID: 3029758.

La generación de las células HepAD38 se describe en el artículo Ladner et al. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1997, PMID: 9257747. Para ello se cotransfectaron los siguientes plásmidos: ptetHBV y el pUHD15-1neo. El ptetHBV contiene una copia del cDNA correspondiente al RNA pre-genómico de HBV cepa ayw bajo el control del promotor de la tetraciclina. El plásmido pUHD15-1neo codifica el regulador transcripcional trans-activador del promotor de la tetraciclina, así como el gen de resistencia a neomicina. A continuación, se aportan los mapas obtenidos de las publicaciones donde se describieron ambos plásmidos.

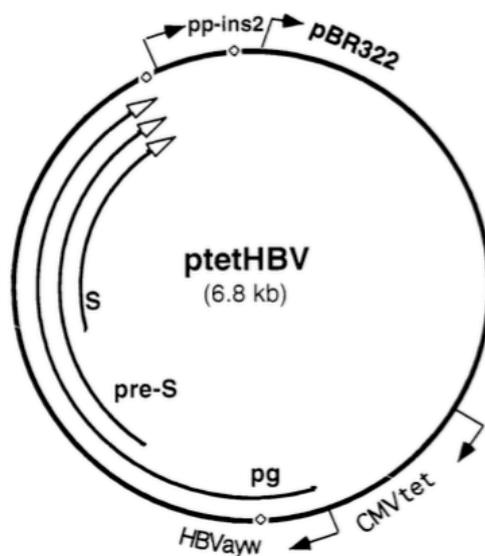
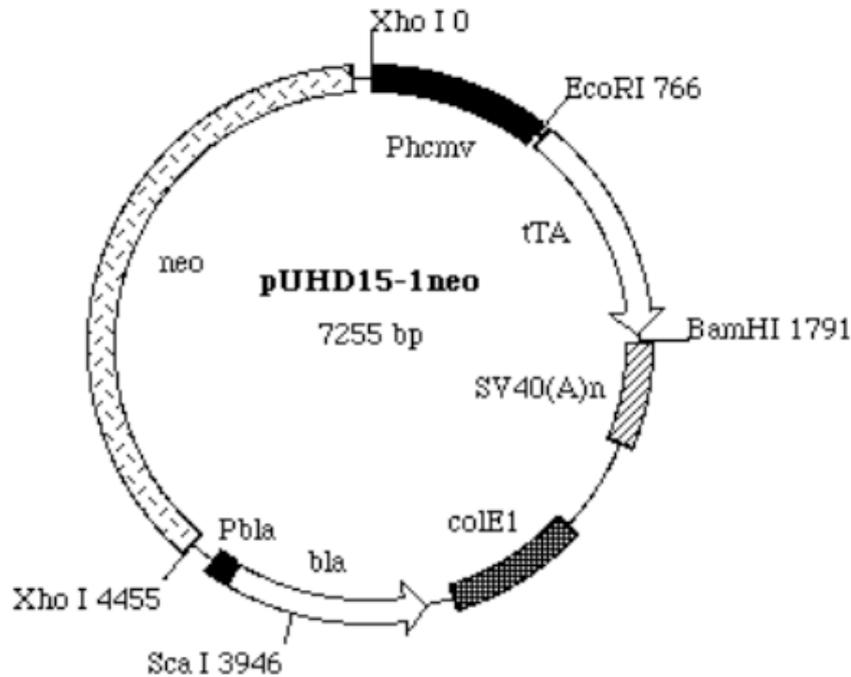


FIG. 1. Physical map of ptetHBV. Shown is a circular map of ptetHBV with the positions of the CMVtet promoter and HBV sequences. The segment marked pp-ins-2 is derived from preproinsulin gene 2, which contains a polyadenylation signal (4). The positions of the three major viral transcripts, pg RNA (pg), presurface mRNA (pre-S), and surface mRNA (S), are indicated by arrows. o, polyadenylation signal.



d. Gama de hospedadores del vector:
E.coli

e. Características de la movilidad del vector:
No aplica

i) factores de movilización
No aplica.

ii) Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?
No aplica.

iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?
Sí, neomicina y puromicina.

5) Información del inserto:

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

La dimensión del genoma de HBV es de 3182 pares de bases. El inserto de las células HepG2.2.15 consta de dos dímeros de la secuencia del genoma de HBV del genotipo D cepa ayw (GenBank: U95551.1), por lo tanto, el inserto tiene una dimensión total de 12728 pares de bases. El inserto de las células HepAD38 consta de algo más de una copia completa del genoma de HBV del mismo genotipo y cepa que en las células HepG2.2.15, siendo el tamaño final del inserto de 3500 pares de bases. La secuencia del genoma de HBV insertada en ambas células es la siguiente:



>U95551.1 Hepatitis B virus subtype ayw, complete genome
AATTCCACAACCTTTTACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCTGTATTTCCCTGCTGGTGGCT
CCAGTTTCAGGAGCAGTAAACCCTGTTCCGACTACTGCCTCTCCCTTATCGTCAATCTTCTCGAGGATTGG
GGACCCTGCGCTGAACATGGAGAACATCACATCAGGATTCTTAGGACCCCTTCTCGTGTACAGGCGGGG
TTTTTCTTGTGGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTC
TAGGGGGAACCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTACCAAACCTCCTG
TCCTCCAACCTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCTCTCATCTGCTG
CTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCGTTTGTCTCTAATTCAG
GATCCTCAACCACAGCACGGGACCATGCGCAACCTGCATGACTACTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCC
CTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCCTCGGGCTTTC
GGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTTCTCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGT
GGTTCGTAGGGCTTTCCCCACTGTTTGGCTTTTCTAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGCCAAAGTCT
GTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAAACC
CTAACAAAACAAAGAGATGGGGTTACTCTCTGAATTTTATGGGTTATGTCATTGGAAGTTATGGGTCCTT
GCCACAAGAACACATCATACAAAAAATCAAAGAATGTTTTAGAAAACCTCCTATTAACAGGCCATTTGAT
TGGAAAGTATGTCAACGAATTGTGGGTCTTTTGGGTTTTGCTGCCCCATTTACACAATGTGGTTATCCTG
CGTTAATGCCCTTGTATGCATGTATTCAATCTAAGCAGGCTTTCACTTTCTCGCCAACCTTACAAGCCCTT
TCTGTGTAACAATACCTGAACCTTTACCCCGTTGCCCGGCAACGGCCAGGTCTGTGCCAAGTGTGTTGCT
GACGCAACCCCACTGGCTGGGGCTTGGTCATGGGCCATCAGCGCGTGGTGGAACTTTTCGGCTCCTC
TGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCCGCTTGTTTTGTCTCGCAGCAGGTCTGGAGCAAACATTTATCG
GACTGATAACTCTGTTGCTCTCCCGAATATACATCGTATCCATGGCTGCTAGGCTGTGTGCCAAC
TGGATCCTGCGCGGGACGTCTTTGTTTACGTCCCGTGGCGCTGAATCCTGCGGACGACCCCTTCTCGGG
GTGCTTGGGACTCTCTCGTCCCCTTCTCCGTCTGCCGTTCCGACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTA
CGCGGACTCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCACTCTGCACGTCGCA
TGGAGACCACCGTGAACGCCACCGAATGTTGCCAAAGGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGC
AATGTCAACGACCGACCTTGGAGCATACTTCAAAGACTGTTTGTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAG
GAGATTAGATTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTTGGTCTGCGCACCAGCACCATGCA
ACTTTTTTACCTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCCTTGGG
TGGCTTTGGGGCATGGACATCGACCCCTTATAAAGAATTTGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCGTTTTTGC
CTTCTGACTTCTTTTCTTTCAGTACGAGATCTTCTAGATACCGCCTCAGCTCTGTATCGGGAAAGCCTTAGA
GTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACTCAGGCAAGCAATTCCTTGTGTTGGGGGAACTAATG
ACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGTTAATTTGGAAGATCCAGCATCTAGAGACCTAGTAGTCAGTTATGTCA
ACACTAATATGGGCCCTAAAGTTTCAGGCAACTCTTGTGGTTTTACATTTCTTGTCTCACTTTTGGAAAGA
AACCGTTATAGAGTATTTGGTGTCTTTTCGGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCCAGCTTATAGACCACCAAAT
GCCCCATCCTATCAACACTTCCGGAAACTACTGTTGTTAGACGACGAGGCAGGTCCCTTAGAAGAAGAA
CTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTGCAGAAAGATCTCAATCTCGGGAAACCTCAATG
TTAGTATTCCTTGGACTCATAAGGTGGGAACTTTACTGGTCTTTATTTCTTCTACTGTACTGTCTTTAA
TCCTCATTGGAAAACACCATCTTTTCTAATATACATTTACACCAAGACATTTACAAAAATGTGAACAG
TTTGTAGGCCCACTTACAGTTAATGAGAAAAGAAGATTGCAATTGATTATGCCTGCTAGGTTTTATCCAA
AGGTTACCAAATATTTACCATTGGATAAGGGTATTAACCTTATTATCCAGAACATCTAGTTAATCATT
CTTCCAAACTAGACACTATTTACACACTCTATGGAAGGCGGGTATATTATATAAGAGAGAAACAACAT
AGCGCCTCATTGTTGGGTACCATATTTGGGAACAAGATCTACAGCATGGGGCAGAATCTTTCCACC
AGCAATCCTCTGGGATTCTTTCCCGACCACAGTTGGATCCAGCCTTCAGAGCAAAACACAGCAAAATCCAG
ATTGGGACTTCAATCCCAACAAGGACACCTGGCCAGACGCCAACAAAGGTAGGAGCTGGAGCATTCGGGCT
GGGTTTACCCACCGCACGGAGGCTTTTGGGTTGGAGCCCTCAGGCTCAGGGCATACTACAAACTTTG
CCAGCAAATCCGCCTCCTGCCTCCACCAATCGCCAGACAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTGTCTCCACCTT
TGAGAAACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTGG

El mapa de restricción del genoma de HBV es el siguiente:



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

Se trata de construcciones que dan lugar a la expresión de todos los genes virales necesarios para la generación de partículas virales infecciosas. Ambas construcciones usadas para generar las células HepG2.2.15 y HepAD38, dan lugar a todas las proteínas de HBV: core (forma la cápside), antígeno e o HBeAg (función inmunomoduladora), antígeno s o HBsAg (función inmunomoduladora), proteínas S, M y L (presentes en la envuelta y responsables de la entrada del virus en la célula), polimerasa (con actividades de retro-transcriptasa, DNA polimerasa y ribonucleasa H) y la proteína X (involucrada en la activación transcripcional episomal). La diferencia entre las construcciones es que en el



caso de las células HepG2.2.15 la expresión del inserto es constitutiva y en el otro caso de las células HepAD38 la expresión es inducible en ausencia de tetraciclina, pero la naturaleza, origen y función del inserto en ambas construcciones es la misma.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:
Heat-shock.

d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto:
Los genes estructurales presentes en el inserto son la proteína core, que forma la cápside del HBV y las proteínas de la envuelta (S, M y L) del HBV que son las responsables de la interacción con el receptor celular (NTCP) permitiendo la entrada del virus en los hepatocitos.

e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:
El inserto contiene todas las secuencias reguladoras para la transcripción de los RNAs mensajeros del HBV (promotores que actúan en *cis*), para el empaquetamiento del RNA pre-genómico (secuencia épsilon) y para su replicación (secuencias DR1 y DR2).

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.
Las secuencias virales son conocidas pero como las funciones de todas ellas no están establecidas completamente son precisamente el objeto de estudio.

VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

Las células modificadas genéticamente que se describen en esta solicitud ya han sido generadas en:
Mount Sinai, Nueva York (EEUU), células Hep2.2.15
Fox Chase Cancer Center, Philadelphia (EEUU), células HepAD38

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?
No.
En caso afirmativo:
No aplica

i) Número de copias:
ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido

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

En caso afirmativo:



i) número de copias:

Se desconoce. No se ha realizado ninguna caracterización de cuantas copias hay de inserto ni en la línea celular HepG2.2.15 ni en la HepAD38.

ii) localización cromosómica:

Se desconoce. No se ha realizado ninguna caracterización de la localización cromosómica donde se encuentra el inserto ni en la línea celular HepG2.2.15 ni en la HepAD38.

iii) secuencias colindantes

Se desconocen.

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

Se desconoce.

c) Si se trata de un virus:

No aplica

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):

i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

ii) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

iii) Tradicionales (nivel de síntesis de proteínas)

Aportar toda la documentación al respecto.

Sells et al. PNAS 1987, PMID: 3029758.

Ladner et al. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1997, PMID: 9257747.

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:

La tasa de multiplicación del OMG (HepG2.2.15 y HepAD38 en ausencia de tetraciclina) es ligeramente más lenta que la del receptor (HepG2) o la del OMG HepAD38 en presencia de tetraciclina (1.5 días en vez de 1 día). Estos datos sugieren que la replicación de HBV entorpece el ciclo celular en dichas células.

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

Sí. El OMG produce y secreta al medio de cultivo HBV infeccioso para el hombre con el riesgo que ello pudiera conllevar. A este respecto hay que indicar que para que la persona que manipulase estos sobrenadantes se infectase con el HBV, las mucosas del



manipulador deberían de estar en contacto directo con el OMG o a través de inoculación parenteral. Esto resulta altamente improbable trabajando y siguiendo las normas de bioseguridad requeridas en el laboratorio NCB3.

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:

Tanto las células HepG2.2.15 como las HepAD38 (en ausencia de tetraciclina) expresan mRNAs y proteínas virales detectables por técnicas de biología molecular e inmunológicas. Asimismo, expresan genes de resistencia a la selección con Neomicina (en las células HepG2.2.15) y Puromicina y Tetraciclina (en las células HepAD38).

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

Se trata de un DNA integrado en el genoma de las células y aunque se utilizó la selección con Neomicina o Puromicina (para las células HepG2.2.15 y HepAD38, respectivamente), dicha presión selectiva no es necesaria para el mantenimiento de la expresión del inserto. En el caso de las HepAD38 sólo se obtiene la expresión del inserto en ausencia de la tetraciclina ya que en su presencia la expresión del inserto se mantiene silente.

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.

Fenotípicamente por adquisición de resistencia a neomicina (en las células HepG2.2.15) o puromicina (en las células HepAD38) y epigenéticamente por la presencia de DNA viral en las células que es fácilmente y específicamente detectable mediante PCR.

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:

Por recogida de virus se utilizan 10 frascos de cultivo con un volumen máximo total de medio de cultivo de 200 ml. Tras las recogidas sucesivas, se obtiene un volumen total de medio de cultivo de 800 ml. A partir de este volumen se purifica el virus

b) Número de plantas:

No aplica

c) Número de animales:

No aplica

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)).

Las células productoras de virus HBV (HepG2.2.15 y HepAD38) se encuentran entre los reactivos biológicos de rutina en nuestro laboratorio. Por lo tanto, su uso será continuado mientras estudiemos el virus de la hepatitis B (mínimo de 5 años que es la duración del contrato que disfruta el responsable científico de la actividad).

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

La finalidad de la utilización de las líneas celulares productoras de HBV es la de producir y purificar las cantidades de HBV necesarias para la realización de estudios de infección en cultivos celulares usando para ello células diana susceptibles a la infección por HBV (HepG2-NTCP). Dichos estudios se centrarán en la identificación y caracterización de factores celulares y virales reguladores de la infección de HBV.

Las células diana (HepG2-NTCP) son células modificadas genéticamente que sobreexpresan la proteína NTCP, por sus siglas en inglés (Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide). Recientemente se ha identificado a la proteína NTCP como el receptor del HBV que permite la entrada del virus en las células diana. Este hallazgo ha permitido la generación de las células susceptibles de infección HepG2-NTCP mediante la introducción del cDNA de NTCP humano en las células HepG2 (también humanas) tal y como se describe en: Yan H et al. eLife 2012. PMID: 23150796. Hay que destacar que, aunque estas células son susceptibles de infección, son muy malas productoras de virus infeccioso por lo que la infección no se propaga dando lugar a una infección de un único ciclo. Esta característica, lógicamente, aumenta la bioseguridad en la actividad.

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:

Las células HepG2.2.15 y HepAD38 (células productoras de HBV) y las células HepG2-NTCP (células diana) provienen de The Scripps Research Institute (La Jolla, EEUU) aunque las células HepG2.2.15 se generaron en Nueva York (EEUU), las HepAD38 en Pensilvania (EEUU) y las HepG2-NTCP en Heidelberg (Alemania).

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 aplicable¹ (tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

¹ Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

Todas las células que provienen de The Scripps Research Institute serán transportadas en avión de carga acompañado de los permisos de importación otorgados por el Ministerio de Sanidad Español. El manejo, embalaje y etiquetado seguirá la normativa internacional y nacional vigente para el transporte de mercancías peligrosas y de sustancias infecciosas.

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

Los cultivos de células se propagan mediante tripsinización y dilución en medios específicos, observando en todo momento la normativa que rige el nivel 3 de contención biológica. Típicamente se crecen las células productoras de virus (HepG2.2.15 y HepAD38) en 10 frascos de cultivo celular de 150 cm² con un volumen de medio de cultivo aproximado de 20 ml por frasco. Durante dos semanas se realizan cambios de medio dos veces por semana en los que se recupera el sobrenadante que contiene el virus, se filtra y se congela. Tras las dos semanas de almacenamiento de virus, cuando se obtienen alrededor de 800 ml, se realiza una concentración del virus por centrifugación dando lugar a 8-10 ml de virus final a una concentración de 5E+09 copias de genoma de HBV por ml.

Los experimentos de infección con el HBV se realizan en las células diana (HepG2-NTCP) en formatos de placas multipocillo de 6 o 12 pocillos por placa y se utilizan alrededor de 10-20 ul del virus concentrado por pocillo, respectivamente.

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

Todos los residuos biológicos que se generen serán inmediatamente inactivados dentro de los recintos de contención (cabinas de bioseguridad) mediante la utilización de germicidas de amplio espectro usados en rotación. Posteriormente, los residuos líquidos ya inactivados se enviarán a la planta de tratamiento de efluentes líquidos del laboratorio y los sólidos se autoclavarán. Los procedimientos de autoclavado y esterilización por calor en la planta "Biovaste" se han validado previamente y se validarán periódicamente mediante la utilización de kits de esporas del microorganismo testigo *Bacillus stearothermophilus*. Estas validaciones se han realizado a nivel interno (servicio de bioseguridad del CNB) y a nivel externo (empresas especializadas en validaciones de estos sistemas). Para mayor información remitirse a la solicitud de autorización de la instalación.

VIII.- **INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN**

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al Centro Nacional de Biotecnología es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

-El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en

- 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. El formulario necesario para acompañar a los OMG en el transporte, puede encontrarse en el siguiente enlace: (<http://www.biodiv.org/biosafety/cop-mop/result.aspx?id=8288&lg=1>)
- Normativa nacional e internacional (OACI/IATA, OMI/MDG, TPF/RID y TPD/ADR) para el transporte de mercancías peligrosas y, en particular, de sustancias infecciosas y muestras para diagnóstico.



determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.

-Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Seguridad Biológica validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

-La instalación dispone de un completo reglamento de funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de seguridad biológica. Con ello se pretende realizar una gestión integral en Bioseguridad. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.

-La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.

-Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma "in situ" y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.

-El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.

-El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.

-No existen zonas residenciales cercanas al CNB.

-No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

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:

Las operaciones indicadas se realizarán en uno de los tres sub-laboratorios del laboratorio de cultivos "in vitro" de nivel 3 de contención biológica con autorización del 7/03/01; número de notificación: A/ES/00/I-8



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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Vienen indicadas en el Plan de emergencias y evacuación incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Viene indicado en el Plan de emergencias y evacuación incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

Documentación:

- Manual de Protección Radiológica, Seguridad Biológica y Química del CNB.
- Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.
- Procedimientos Normalizados de Trabajo del Servicio de Seguridad Biológica del CNB.

Cursos y seminarios:

- Seminarios generales sobre normas de seguridad frente a agentes biológicos, químicos y radiactivos impartido por el Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica del CNB.
- Seminarios específicos sobre el Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.

4) Planes de emergencia:

El Plan de emergencias y evacuación del laboratorio se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.



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

Nº de Registro:	Nº de Notificación:
-----------------	---------------------

Cumplimentar un formulario tipo C por cada actividad tipo 2, 3 o 4. En caso de actividades tipo 1, deben seguirse las instrucciones recogidas en el apartado III.1.a de la Guía para la remisión de solicitudes de registro de instalaciones.

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

1) Entidad

Nombre: [Centro Nacional de Biotecnología \(CSIC\)](#)
Dirección postal: [c/ Darwin 3](#)
[28049 - Madrid](#)

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: [Fernando Rojo de Castro](#)
NIF: [50295113-R](#)
Cargo: [Director del CNB](#)
Tel: [91 585 45 03](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: direccion@cnb.csic.es

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: [Urtzi Garaigorta de Dios](#)
NIF: [20223585-F](#)
Cargo: [Investigador Contratado](#)
Tel: [91 585 45 33](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: ugaraigorta@cnb.csic.es

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

Nombre y apellidos: [Fernando Usera Mena](#)
NIF: [00694865-N](#)
Cargo: [Responsable del Servicio de Seguridad Biológica y Protección Radiológica](#)
Tel: [91 585 45 41](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es

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

[Fernando Usera Mena](#)



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

1. Objetivo de la actividad:

Estudio de los factores celulares y virales que regulan la infección del virus de la hepatitis B (HBV) utilizando para ello un sistema in vitro de infección de células en cultivo.

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).

Tanto las células recombinantes productoras de HBV (HepG2.2.15 y HepAD38) como las células diana (HepG2-NTCP) se encuentran entre los reactivos biológicos de uso rutinario para el estudio de la infección por HBV. Por lo tanto, su uso será continuado mientras estudiemos el virus de la hepatitis B (al menos durante los 5 años de contrato del que disfruta actualmente el investigador responsable científico de la actividad).

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.

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:

Línea celular de hepatoblastoma humano (HepG2). Potencial tumorigénico por inoculación accidental.

b) Organismo donante:

Virus de la hepatitis B, patógeno humano capaz de inducir hepatitis, fibrosis hepática y cirrosis. También puede dar lugar a hepatocarcinoma.

c) Inserto:

Genoma completo del HBV genotipo D cepa ayw (GenBank: U95551.1). El inserto da lugar a la expresión de todas las proteínas virales necesarias para la replicación del virus en las células receptoras dando lugar a la producción y secreción en el sobrenadante de virus HBV potencialmente infeccioso para los humanos.

d) Vector:

Los vectores que se emplearon para generar el OMG contenían las secuencias mínimas para la propagación de los plásmidos en E.coli y conferir resistencia a las bacterias portadoras del plásmido.

e) Organismo modificado genéticamente resultante:

El OMG resultante son células de hepatoblastoma humano que producen y secretan el virus completo e infeccioso de HBV al medio de cultivo.

f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal:

El virus secretado por las células productoras de virus (HepG2.2.15 y HepAD38) tiene un potencial patogénico semejante a cualquier virus de HBV circulante en la sociedad. La infección debida a la manipulación de las células productoras podría darse por el contacto



directo de las mucosas del manipulador con el sobrenadante material de cultivo de las células productoras de virus y también en el caso de la inoculación parenteral.

g) Efectos para el medio ambiente:

Se desconocen.

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	<input type="checkbox"/>
Tipo 2	<input type="checkbox"/>
Tipo 3	<input checked="" type="checkbox"/>
Tipo 4	<input type="checkbox"/>

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).

La actividad se va a llevar a cabo en el laboratorio de contención de nivel 3, por lo que el organismo modificado estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo. El riesgo de inoculación accidental del virus recombinante es prácticamente nulo debido a la ausencia de material punzante y cortante en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica y no hay riesgo de contagio por contacto.

b) Concentración y escala utilizadas.

Típicamente se crecen las células productoras de virus (HepG2.2.15 y HepAD38) en 10 frascos de cultivo celular de 150 cm² con un volumen de medio de cultivo aproximado de 20 ml por frasco. Durante dos semanas se realizan cambios de medio dos veces por semana en los que se recupera el sobrenadante que contiene el virus, se filtra y se congela. Tras las dos semanas de almacenamiento de virus, cuando se obtienen alrededor de 800 ml, se realiza una concentración del virus por centrifugación dando lugar a 8-10 ml de virus final a una concentración de 5E+09 copias de genoma de HBV por ml. Los experimentos de infección con el HBV se realizan en las células diana (HepG2-NTCP) en formatos de placas multipocillo de 6 o 12 pocillos por placa y se utilizan alrededor de 10-20 ul del virus concentrado por pocillo, respectivamente.

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 trata de líneas celulares modificadas cuya supervivencia y crecimiento solo es posible en condiciones de esterilidad en superficies de plástico tratado especialmente dentro de un incubador con temperatura, humedad y niveles de CO₂ controlados. La producción de virus HBV se realizará a partir de las células productoras (HepG2.2.15 y HepAD38) empleando para su cultivo frascos con tapón de filtro. Los experimentos de infección con HBV en las células diana (HepG2-NTCP) se realizarán en placas multipocillo en contenedores secundarios con filtro. Tanto los frascos como las placas multipocillo se introducirán en cajas transparentes cerradas y resistentes a prueba de caída. Tanto la producción y concentración de virus como su utilización en experimentos de infección se



llevarán a cabo en el laboratorio de contención biológica de nivel 3, por lo que el personal y el entorno expuestos se reduce al máximo.

La probabilidad de que se produzcan efectos nocivos directamente derivados de la actividad descrita anteriormente se limita exclusivamente al personal expuesto. En caso de inoculación accidental de material infeccioso se prevé una probabilidad muy baja de desarrollo de una infección crónica, dado que la infección por HBV en personas adultas cursa de manera aguda en un 95% de los casos. Por otra parte existe una vacuna profiláctica muy eficiente contra el HBV por lo que el riesgo de infección es todavía menor para todo el personal que haya recibido la vacuna previamente.

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

Actividad confinada de Tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

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.)**

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al Centro Nacional de Biotecnología es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

-El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.

-Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Seguridad Biológica validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

-La instalación dispone de un completo reglamento de funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de seguridad biológica. Con ello se pretende realizar una gestión integral en Bioseguridad. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.

-La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.

-Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma "in situ" y en la consola



de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.

-El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.

-El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.

-No existen zonas residenciales cercanas al CNB.

-No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

-Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

Vienen indicadas en el Plan de emergencias y evacuación del CNB incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

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

Vienen indicados en el Plan de emergencias y evacuación del CNB incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

d) Planes de emergencia (para actividades tipo 3 y 4).

El Plan de emergencias y evacuación del laboratorio se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio