



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

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. Responsables de la actividad

a. Entidad

Nombre: **Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra**

Dirección postal: **Avd/Conocimiento, 17-Armilla; CP: 18016-Granada**

b. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: **Fuencisla Matesanz del Barrio**

NIF: **13114121G**

Cargo: **Directora**

Tel: **958181668**

Correo electrónico: **direccion.ipbln@csic.es**

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: **Dra. María del Carmen Thomas Carazo**

NIF: **24225512A**

Cargo: **Investigador Principal**

Tel: **+34 958181662**

Correo electrónico: **mcthomas@ipb.csic.es**

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

Nombre y apellidos: **Fuencisla Matesanz del Barrio**

NIF: **13114121G**

Cargo: **Directora**

Tel: **958181668**

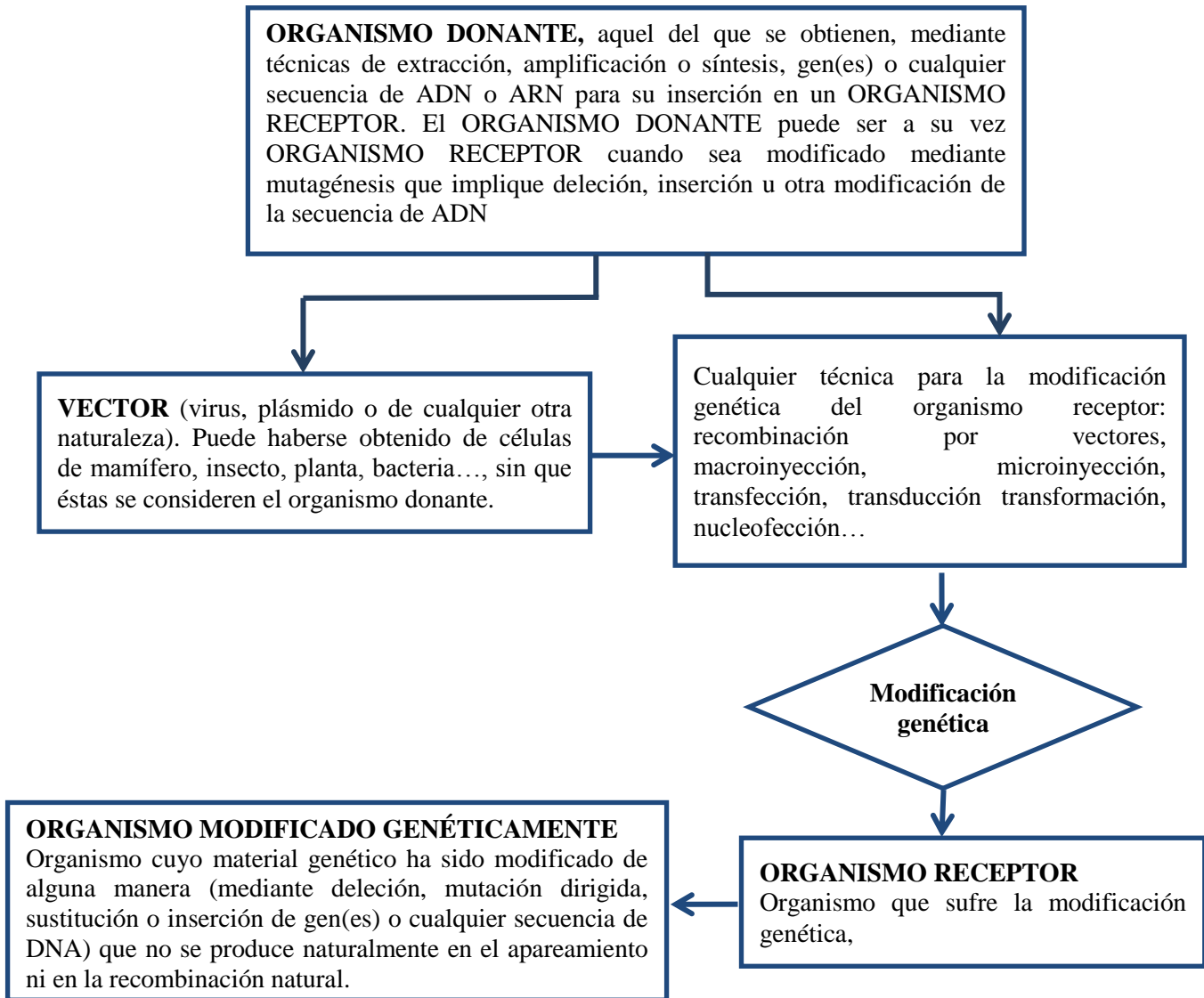
Correo electrónico: **segbiologica@ipb.csic.es, direccion.ipbln@csic.es**

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

segbiologica@ipb.csic.es,



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





II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1. 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:

Avances en el conocimiento inmunológico y molecular para el control de la enfermedad de Chagas.

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

Referencia: PID2019-109090RB-I00 (1/06/2020- 31/05/2024).
IP: MC Thomas y M.C. López.

- Organismo financiador:

AEI-MINECO; Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad (Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación).

Otro tipo de financiación²

2. Instalación donde se va a desarrollar la actividad (si la instalación no está autorizada, cumplimente el Formulario Parte B):

- Número de referencia de la notificación de la instalación (A/ES/./I-..):

A/ES/19/I-17

- Fecha de autorización de la instalación:

20-08-19

Si el OMG no se genera en la instalación³:

- Nombre de la instalación de origen del OMG:

- Número de referencia de la notificación de la actividad en el caso de que se realice en España (A/ES/./../..)

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.

²Se deberá aportar la información que permita verificar esta circunstancia.

³Debe tenerse en cuenta que, si los OMG proceden de otra instalación española, ésta deberá haber cumplido con los requisitos establecidos en la legislación española de OMG.





- Número de referencia de la notificación de la instalación en el caso de que se ubique en España (A/ES/./I-..):

- Explicar cómo se realiza el transporte del OMG desde la instalación de origen teniendo en cuenta la legislación aplicable (especificar tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado)⁴:

3. Finalidad de la actividad:

Transfección (electroporación) de la forma epimastigote no infectiva de *Trypanosoma cruzi* con construcciones que portan el gen codificante de luciferasa y en las que se clonarán corriente arriba del gen codificante de luciferasa o de la GFP la secuencia Pr77 mutada en distintas posiciones a lo largo de su secuencia. La secuencia Pr77 ha mostrado tener capacidad de activar la transcripción génica por lo que así se podrá valorar las diferentes modificaciones que en la secuencia de Pr77 se asocian a función y, por el contrario, pérdida de capacidad promotora.

4. 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 3

Tipo 4

III. INFORMACIÓN RELATIVA A LA OBTENCIÓN DEL OMG

1. Organismo receptor del cual deriva el OMG:

Células humanas/primates Detallar las líneas celulares:

Células: otras Detallar las líneas celulares:

Animal

⁴ 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](#). Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE núm. 268, 8.11.2007)
- 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/>
- [Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances](#) Edición bianual de la OMS



- Planta
- Bacteria
- Hongo
- Virus
- Protozoos

-Especificar el nombre científico y común:

Trypanosoma cruzi

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i) Técnicas de aislamiento: **En nuestro caso, se cultivará la forma epimastigote (NO INFECTIVA) de *T. cruzi* en medio LIT suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, a 28°C**
- ii) Técnicas de identificación: **Observación directa del parásito mediante microscopio. Examen microscópico del parásito, identificación y localización subcelular de proteínas mediante inmuno-transferencia (Western-blot) e inmunofluorescencia indirecta (IFI), Amplificación de fragmentos de DNA correspondientes a genes constitutivos mediante PCR y qPCR, Análisis de la expresión génica de genes constitutivos y de mensajeros de luciferasa mediante RT-qPCR y Northern-blot.**
- iii) Marcadores genéticos: **(no se van a emplear ya que la cepa a usar está ya tipada). Genes constitutivos como rDNA (18S y 24S), β -tubulina, gen que codifica para el RNA del *spliced leader* (SL).**
- iv) Marcadores fenotípicos: **Forma epimastigote (NO INFECTIVA): alargado y con el kinetoplasto localizado anteriormente al núcleo, es la forma replicativa en el tracto digestivo del invertebrado y en medio de cultivo.**
- v) Estabilidad genética: **Estable**

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

SI

– Especificar cómo se sabe que está libre de agentes biológicos contaminantes.

**Se trata de cultivos puros identificados mediante examen microscópico
Proceden de cultivos de hace varias décadas. Se ha secuenciado el genoma de
distintas cepas.**

NO

– Especificar si se conocen o se sospecha cuáles pueden ser.

c. Modificación genética anterior:

SI

– Describir:



- Cambios en virulencia, patogenicidad, tropismo, toxicidad, otros efectos.

NO

- d. Se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos intra/extracelulares (Asignar grupo de riesgo conforme al anexo II de Real Decreto 664/1997 tras evaluación del riesgo específica):

Según la clasificación en la EU es GRUPO 3 (Directiva 2000/54/CE): Cabe resaltar que la forma del parásito que se cultivará en las instalaciones de nuestro centro será la forma epimastigote (NO INFECTIVA). Si bien la forma infectiva no se va a usar, comentar que existe una forma infectiva de *Trypanosoma cruzi* denominada forma tripomastigote la cual es potencialmente patógeno para seres humanos y animales. En el caso del organismo muerto o sus productos extracelulares no son considerados como patógenos.

SI

Para:

- | | |
|----------|-------------------------------------|
| Humanos | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Animales | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Plantas | <input type="checkbox"/> |
| Otros | <input type="checkbox"/> |



- Posibles efectos alérgicos y/o tóxicos (describir):

Produce la denominada Enfermedad de Chagas ([https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)))

NO

- e. En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI NO

- f. Experiencia previa adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor:

El laboratorio y su personal han adquirido durante numerosos años una dilatada experiencia en el manejo y trabajo en las condiciones de seguridad y contención de dicho organismo.

- g. Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente:

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

SI

- Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

esporas

endosporas

quistes

esclerocios

esporas asexuales (hongos)

esporas sexuales (hongos)

otros, especifíquese

NO

- ii) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

No procede

- iii) Posibles nichos ecológicos:

Vectores triatominos que no existen en España, solo en America.

- iv) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No procede

- h. Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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



No muestra ningún efecto.



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Como hemos comentado anteriormente, la forma infectiva de estos parásitos (que no es la que se va a transformar) infectan insectos triatomínicos, que son el vector de la enfermedad. Estos insectos solo se encuentran en Latinoamérica y no existen en España (ni el resto de Europa). Puede infectar una gran variedad de especies animales, pero necesita del vector (infectado) para transmitirse de forma natural.

i. Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:

Al igual que el vector que lo transmite, *T. cruzi* se puede encontrar en el continente americano, principalmente en América latina), desde Estados Unidos hasta Chile y el centro de Argentina. En EE.UU, se cree que este parásito es endémico en aproximadamente la mitad sur del país, al igual que en California. Pero debido a flujos migratorios y a los movimientos poblacionales de personas infectadas desde estas zonas endémicas a Europa y resto del mundo, la enfermedad se ha globalizado.

j. Hábitat natural del organismo:

Existen 3 ciclos básicos en la transmisión de *T. cruzi*. En el ciclo selvático (salvaje), este organismo realiza el ciclo entre las especies silvestres y los insectos triatomínicos que habitan en ambientes selváticos. Los humanos y los animales domésticos se infectan ocasionalmente cuando entran en contacto con estos insectos en el hábitat natural. En ciertas circunstancias, los insectos también pueden invadir los hogares en zonas rurales o dependencias cuando son atraídos por la luz, el calor o determinados olores, y pueden contaminar los alimentos (caso de contaminación oro-digestiva por *T. cruzi* en una escuela de Venezuela: Díaz-Bello, Z. *et al.* Epidemiol. Infect. 2014, 142, 156-162). Los insectos triatomínicos silvestres también pueden ser transportados accidentalmente a los hogares de los humanos. El ciclo selvático es responsable de relativamente pocos casos de enfermedad de Chagas (es el único ciclo en EE.UU). También existe un *ciclo de transmisión doméstica* en México y partes de Centroamérica y Sudamérica. En este ciclo, algunos insectos vectores han colonizado adobes primitivos, pastos y casas con techos de paja, lo que ocasionó la transmisión entre humanos e insectos. Los ciclos de transmisión entre insectos y animales domésticos (*ciclos peri-domésticos*) también generan la oportunidad de que el parásito infecte a humanos.

2. Organismo(s) donante(s). No completar el punto si no existiese organismo donante o si es el mismo que el organismo receptor.

- | | |
|-----------|-------------------------------------|
| Humanos | <input type="checkbox"/> |
| Animal | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Planta | <input type="checkbox"/> |
| Bacteria | <input type="checkbox"/> |
| Hongo | <input type="checkbox"/> |
| Virus | <input type="checkbox"/> |
| Protozoos | <input type="checkbox"/> |

-Especificar el nombre científico y común:



Luciérnaga (*Photynus pyralis*) y Medusa (*Aequorea victoria*)

a. Se trabaja con él durante la actividad:

SI NO

b. La cepa/línea celular donante: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

SI

– Especificar cómo se sabe que está libre de agentes biológicos contaminantes.

No procede

NO

– Especificar si se conocen o se sospecha cuáles pueden ser.

No procede

c. Modificación genética anterior:

SI

– Describir:

– Cambios en virulencia, patogenicidad, tropismo, toxicidad, otros efectos.

No

d. Se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos intra/extracelulares. (Asignar grupo de riesgo conforme al anexo II de Real Decreto 664/1997 tras evaluación del riesgo específica):

SI Para:

Humanos

Animales

Plantas

Otros

– Posibles efectos alérgicos y/o tóxicos (describir):

NO

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

SI NO



- f. Tipo de material genético obtenido del organismo donante (gen codificante o fragmento del mismo. miRNA, lncRNA, etc.):

ADN correspondiente a genes reportadores que codifican para luciferasa en el caso de que el organismo donante sea *Photynus pyralis* o la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*

- g. Método de obtención:

- Extracción
- PCR
- Síntesis *in vitro*

- h. Función del gen/genes o secuencias en el organismo donante:

Emisión de luminiscencia cuantificable. La luciferasa es un término genérico para la clase de enzimas oxidativas relacionadas con bioluminiscencia. La luciferasa consume/oxida el pigmento luciferina con gasto de ATP (que en la célula suele proceder de la transformación del pirofosfato por el enzima sulfurilasa). La reacción de oxidación libera luz, de color diferente según la composición de la luciferina y luciferasa, lo que explica la producción de varios colores, en distintas especies de organismos. La función de la GFP es dar visibilidad y luz verde a la medusa.

3. ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?

No



IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1. Objetivo de la modificación genética (sobreexpresión, silenciamiento, otros):

Identificar los nucleótidos esenciales para dicha función promotora de Pr77. Así, se analizará si las mutaciones, que de manera natural se encuentran en la secuencia promotora Pr77 de 77 nucleótidos de longitud, afectan la capacidad promotora de Pr77. Para ello, las diferentes secuencias Pr77 portando las mutaciones de interés se clonarán corriente arriba de un gen reportero y se analizará la existencia y abundancia del mensajero en caso de haber transcripción en transformantes de *T. cruzi*. El tener clonado el gen Luc o el GFP en vez de CAT nos permitirá cuantificar tanto los mensajeros de los reporteros como las proteínas resultantes y no tener que usar radioactividad que para medir la proteína CAT es necesaria.

2. Tipo de modificación genética:

- Inserción de material genético
- Deleción de material genético
- Sustitución de bases
- Otros, especifique:

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

- Transformación
- Electroporación
- Macroinyección
- Microinyección
- Infección
- Transfección
- Fusión celular

Otros, especifique:

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a. Tipo e identidad del vector (plásmido, virus, otros):

**Vector de expresión para *T. cruzi* y *Leishmania*: pTEX.
(<https://www.addgene.org/vector-database/4365/>)**

i) Aportar mapa de restricción del vector. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación y cualquier otro elemento presente en el vector.



pTEX es un vector para la transfección de *T. cruzi* y *Leishmania* derivado del vector plasmídico pBSSK+ . Al mismo se le incluyó el gen de produce resistencia a neomicina neoR (1913-2698) que permite que los parásitos que portan el vector crezcan en presencia de neomicina fosfotransferasa (G418). En el vector pTEX, el gen neoR, al igual que la secuencia MCS (Multi-Cloning Site) que es diana de diferentes endonucleasas de restricción, para el clonaje de la secuencia de interés, están flanqueadas por las regiones intergénicas del gen gliceraldehído 3'fosfato deshidrogenasa (GAPDH I) de *T. cruzi*. El vector (al derivar de pBSSK) porta un origen de replicación (ori) y el gen de resistencia a ampicilina ampR (4678-5538).

La digestión del vector con los siguientes enzimas daría los siguientes tamaños (kb): *PstI* (4.8, 0.65, 0.2), *BamHI* (5.6), *EcoRI* (5.6), *KpnI* (5.6). (ATCC staff) [Information source: Vector: doi: 10.1093/nar/20.15.3963.

ii) Si se trata de virus:

- Es defectivo en replicación SÍ NO
- Indicar cómo se obtiene el vector viral. Si se utilizan plásmidos para su obtención aportar mapa de restricción del/los plásmidos. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes.

b. Gama de hospedadores del vector:

Además de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp.*, el vector puede replicarse en bacterias *E. coli* lo cual se usa para obtener cantidad de DNA de plásmido suficiente para clonaje y transfección del parásito.

c. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

No posee.

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

No procede.

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

No.

5. Información de la secuencia insertada, delecionada o modificada.

a. Función específica de cada parte de la secuencia insertada, delecionada o modificada:

El inserto denominado Pr77 son 77 nucleótidos, secuencia que ha mostrado activar la transcripción de genes reporteros. El gen codificante de luciferasa de luciérnaga (1653pb) se obtiene por digestión de una construcción anterior (pGEMT-LUC,



Promega) con *BamHI* (que corta inmediatamente anterior al ATG iniciador). Posteriormente, los extremos son corregidos con *Klenow* y se digiere de nuevo con el enzima *Sall*, la cual corta corriente abajo del codón de parada de luciferasa. El fragmento (pese a no haber sido amplificado ni modificado por PCR) es secuenciado para confirmar su secuencia antes de introducirlo en el vector pTEX

>luciferasa (1653pb)

```

ATGGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCTCTAGAGGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCA
TAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGAACATCACGTACG
CGAATACTTTCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCTGTA
TGCAGTGAAAACCTCTTTCAATTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCAACGA
CATTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGAACATTTCCGACGCTACCGTAGTGTGTTTCCAAAAAGGGGTTGC
AAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAATTACCAATAATCCAGAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGA
TTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGGTTTAAATGAATACGATTTTGTACCAGAGTCCTTTGA
TCGTGACAAAACAATTGCACTGATAATGAATTCCTCTGGATCTACTGGGTTACCTAAGGGTGTGGCCCTCCGCATAGAA
CTGCCTGCGTCAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCGGATACTGCGATTTTAAGTGT
GTCCATTCCATCACGGTTTTTGGAAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAG
ATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGATCCCTTCAGGATTACAAAATTCAAAGTGCCTTGGCTAGTACCAACCCCTATTTTCAT
TCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATGCTTCTGGGGGCGCACCTCTTTCG
AAAGAAGTCGGGAAGCGGTTGCAAAACGCTTCCATCTTCCAGGGATACGACAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATC
AGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTGCGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTG
TGGATCTGGATACCGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAGAGAGGCGAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTATGTCCGGT
TATGTAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATCTGGAGACATAGCTTACTGGGA
CGAAGACGAACACTTCTTCATAGTTGACCGCTTGAAGTCTTTAATTAATAACAAGGATATCAGGTGCCCCCGCTGAAT
TGGAATCGATATTGTTACAACACCCCAACATCTTCGACGCGGGCGTGGCAGGTCTCCCGACGATGACGCGCGTGAACCT
CCCCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAA
AACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTTGTTGACGAAAGTACCGAAAGGTTTACCAGAAAACTCGACGCAAGAA
AAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAATGTAA

```

ATG **codón de iniciación**
TAA **codón de terminación**

>eGFP

```

atggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgccccatcctggctcgagctggacggcgacgtaaaccggccaaa
gttcagcgtgtccggcgagggcgaggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcactctgcaccaaccggcaagc
tgcccgctgcctggcccaccctcgtgaccacctgacctacggcgtgagctgcttcagccgctaccggaccacatgca
cagcagcactcttcaagtcggccatgcccgaaggctacgtccaggagcgaccatcttctcaaggacgagcggcaacta
caagaccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaaccgcatcgagctgaaggcatcgactcaaggagg
acggcaacaatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgctctatatcattggccgacaagcagaaga
ggcatcaaggtgaactcaagatccgcccacaacatcgaggacgycagcgtgagctcgccgaccactaccagcagaacac
ccccatcggcgagcggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagctccgcccctgagcaagaccccaag
agaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgcccgggatcactctcggaatggacgagctgtacaagta
tcagatctcgagctcaagcttcgaattctgcagtcgacggtaaccgcccgggatccaccggatctagaataactga

```

>pTEXLUC (6778pb) Construcción completa

```

GTA  

AAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGCAGTAGCTGCCCT  

ACCCACAACA  

ACTACTCTAGTCTAGGCACCCTCATTTTCATCTATCGGTATCCGCATTCAGGAAGTGAGCGAAGTTCAA  

CAGTTGCCAGTTTCTTCAGGAGACTCAAAAAACAGACACAACAGTCTTATTAGACAAGAGCACAACAAATTTCTCAT  

TGCATT  

CAGAAGCAAACAAACAAACAAAAACAAATGCGGAAAAATACCTCAAATTTATTTTATGTCTGTCTCTACAA  

ATAATAATAATAATAATAATAATTACAGCGGCCGTAAATGAATGCAAGAAAAGAAACACAAAACCCACAATTGTCAAC  

CTCCCCTT  

CATTCCACTTGTCTCTCTTTTCCACGTTTCTTGCACGAATGCAGAAAGTGATATTTTACTTTGAAAGC  

CATCTACCAACAACAATTACATTGAACAGAATTTAGA  

ACTAGTGGATCCCCCGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGC  

TGATCCAAATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCTCTAGAGGATGGAACCGCTGGAG  

AGCAACTGCATAAAGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGA  

ACATCACGTACGCGGAATACTTCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATC  

ACAGAATCGT  

CGTATGCAGTGAAAACCTCTCTTCAATTTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTTATCGGAGTTGCAG  

TTGCGCCCGCAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGAACATTTTCGACGCTACCGTAGTGTG  

TTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAATTACCAATAATCCAGAAAAATTATTATCATGGATT  

CTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGGTTTAAATGAATACG

```



ATTTTGTACCAGAGTCCTTTGATCGTGACAAAACAATTGCACTGATAATGAATTCCTCTGGATCTACTGGGTTACCTA
AGGGTGTGGCCCTTCCGCATAGAACTGCCTGCGTCAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCATATTTTTGGCAATCAAATCA
TTCCGGATACTGCGATTTTAAAGTGTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATAT
GTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGATCCCTTCAGGATTACAAAATTCAAA
GTGCGTTGCTAGTACCAACCCTATTTTCATTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAAATACGATTTATCTAATTTAC
ACGAAATTTGCTTCTGGGGGCGCACCTCTTTTCAAAGAGTCCGGGAAGCGGTTGCAAAAACGCTTCCATCTTCCAGGGA
TACGACAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGG
TCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGAAAAACGCTGGGCGTTAATCAGAGAG
GCGAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAAACAATCCGGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACA
AGGATGGATGGCTACATTTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATAGTTGACCGCTTGAAGT
CTTTAATTAATAACAAAGGATATCAGGTGGCCCCGCTGAATTTGGAATCGATATTGTTACAACACCCCAACATCTTCG
ACGCGGGCGTGGCAGGTCTTCCCAGCATGACGCCGGTGAACCTTCCGCGCGGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAAGA
CGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCCAGTCAAGTAAACAACCGCAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGT
TTGTGGACGAAGTACCGAAAGGCTTACCAGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCCTATAAAGGCCAAGA
AGGGCGGAAAGTCCAAATTTGTAATGTAAGTGTATTACGCGATGACGAAATCTTAGCTATTGTAATCCTCCGAGGC
CTCGAGGTGCACCTCGAGCCATTTACGACTCCAAGGCAACGCTGCAGAACAACCTGCCGAAGGACGCGCGCTTCTTCA
AGATTGTGTGCGTGGTACGACAACGAGTGGGGATACTCCACCAGCTGGTGGACCTGTACGCACATGGCCTCGAAGG
ATCGTTCCGGCAAGGTTGTAGGCGTGGCGGATGACTTCAGGCTTTCTTTTGCGAATAGGGATCTTATAATACACGATG
GTGTCCTCGTATGATCGTTACCAGGTGCTGCCAGATCCAATTGACACAGCGTCAAGAGCAAAAACAATTTTACTTTTTCC
CTTTAAGGACAACAACAAAAAATATATAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAATTATATTTATGGTCATCT
TTGGGAAACAAAAAGCAGCAATTTAATGATGCGGAAGGATGAGTAAAATAATGTTAATCAATGTACGAGGATTTGGG
GTATTGCAAGGAAAATGTAGATGATTTAATTGGGTGTGTGATGCAGCTTGTGGTAATTTTTGCTCACTTCCTTTTTGC
CCACATCTTTTTAGTTTTTCTGCTTTTCTTTCCCATTAATCCACTTGTCTCTTTTTCCACGTTTCCCTGCACGAA
GCAGAAAGTGATATTTTTACTTTGAAAGCCATCTACCAACAACAATTACATTGAACAGAATTTGGGATTGCGAATTA
TTCTGCAGCCCGCGTGTGGCCTCGAACACCCGAGCGACCCCTGCAGCCAATATGGGATCGGCCATTGAACAAGATGGA
TTGCACGCGAGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCT
GATGCCGCGGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAAT
GAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCCTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTC
ACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCAGGGGAGGATCTCCTGTCTCATCTCACCTTGTCTGCC
GAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACAAG
CGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATC
AGGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTCCGCAAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATG
GCGATGCCTGCTTCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGG
CGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGCGAATGGGCTGACCGCTTCC
TCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGGGG
ATCGATCCGGAACAACCTGCCGAAGGAGCGCCGCTTCTTCAAGATTGTGTGCTGGTACGACAACGAGTGGGGATACTC
CCACCAGCTGGTGGACCTTGTACGCCACATGGCTCGAAGGATCGTTCGGCAAGGTTGTAGGCGTGGCGATGACTTCA
GGTCTTTCTTTTGCGAATAGGGATCTTATAATACACGATGCGTGTCCCGTATGATCGTTACCAGGTGCTGCCACGATC
CAAGTACACAGTGTCAAGAGCAAAAACAATTTTACTTTTTCCCTTTAAGGACAACAACAAAAAATATATAACTTTTTT
TCTTTTTTTTTTTTTTTGAAATTATATTTATGGTCATCTTTGGGAAACAAAAAGCAGCAATTTAATGATGCGGAAGGAT
GAGTGAATAAATGTTAATCAATGTACGAGGATTTGGGGTATTGCAAGGAAAATGTAGATGATTTAGTTGGGTGTATG
ATGCAGCTTGTGGTAATTTTTTACAACCTTTGCGTTATTGGAAGATTTGGTTGTTCAGTTTTCTTTTTGTTTTATAACTG
ACTGTTTTAATTTAGTGTGATTTTTTTTTTTTTAAGGATTTAAGCTGTTTTTCTTTTTTTTTCTTTTCTTCACTGATG
GTGTTAAGGTGTAGTTTAGTGTGTTGTGCATTATGCGTCGTAGTGTGTTGTTCTTTGGACTTTTTCGAACAATACTG
GGCATTATAGCCACCTGTGTATATGCCGCTAGAGTATGCTAGCCGTGTGGGTACCCAGCTTTTTGTTCCCTTTAGTGA
GGGTAAATTTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCAATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAATTCACAC
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTCGCTTGGCG
TCACTGCCCGCTTTCCAGTCCGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGT
TTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCTGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGCTCGGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCA
GCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAAGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAG
CAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAA
AATCGACGCTCAAGTACAGAGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC
GTGCGCTCTCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCTCTTCCGGAAGCGTGGCGCTTTCT
CATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAGAACCCCCGTT
CAGCCCCAGCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA
GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCCTAACTAC



```

GGCTACACTAGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCT
TGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGA
TCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTC
ATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAT
GAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCC
ATAGTTGCCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATA
CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT
CCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGT
TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGT
TCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTT
GTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTTCATGCCATCC
GTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCT
TGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATTCATTGGAAAACGTTCTTCG
GGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCA
GCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCG
ACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATGAAGCATTATCAGGGTTATGTCTCATGAGC
GGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGC

```

Vector pTEX
 Luciferasa
 neoR
 GFP sustituiría a luciferasa en este clon en caso de ser necesario

b. Información sobre los genes estructurales:

Gen reportero Luciferasa y gen de resistencia a neomicina (en el apartado anterior se describe su secuencia.)

c. Información sobre los elementos reguladores:

La secuencia de la región 5'GAPDH se eliminó y sustituyó por secuencias derivadas de la región promotora Pr77 de tripanosomátidos (ya descrita). Esta secuencia presenta capacidad de activar la transcripción de genes mediada por RNA polimerasa II.

d. ¿Ha sido secuenciada?

Sí.

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

No.

f. ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.

No.

6. Si se ha utilizado un vector, ¿cuál es su situación final en el OMG?

a. Si el vector es un plásmido

- i) Se pierde
- ii) Se inserta en el genoma
- Aleatoriamente
- En un sitio definido



- Localización cromosómica:

- Secuencias colindantes:

- La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

- iii) Se mantiene en forma episómica

- Número de copias:

Se obtienen transfectantes estables bajo una determinada presión de antibiótico (neomicina). Así, el número de copias se relaciona con la presión de neomicina. Si se elimina el antibiótico seleccionador, el parásito elimina el plásmido.

- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

Mediante presión con antibiótico (neomicina) se obtienen transfectantes estables y ahí el plásmido es estable hasta que se elimina el antibiótico seleccionador.

- b. Si el vector es un virus:

- i) Se mantiene en forma episómica

- ii) Se inserta en el genoma

- La inserción se produce al azar

- La inserción es específica

- Localización cromosómica:

No es integrativo.

- Secuencias colindantes:

- La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

- iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas. Justificar:

No.

- c. Análisis moleculares previstos relativos a la expresión del producto deseado (*PCR, Southern, Northern, secuenciación, otros*):

- i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

- ii) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

- iii) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)



V. **INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (OMG)**

1. Descripción del OMG final

Formas epimastigotes de *T. cruzi* (NO INFECTIVAS) que contienen mediante electroporación un plásmido episomal cuya estructura, de forma general, consiste en un gen reportero de luciferasa o GFP bajo el control transcripcional de una serie de secuencias derivadas del promotor Pr77 de *T. cruzi*. Además, contiene el gen que confiere resistencia a neomicina, así como también un origen de replicación, todo ello en el vector pTEX de tripanosomátidos.

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 ser humano, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar:

No

- 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:

Expresión de luciferasa o de GFP

3. Información sobre la estabilidad genética previsible del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):

La permanencia del plásmido en el citoplasma del parásito transformado es dependiente de la presión de antibiótico seleccionador (neomicina). Si no existe esta presión el epimastigote no replicará el plásmido pues no lo necesita.

4. Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos. Justificar:

Ninguna.

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:



- a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Detección de la expresión de luciferasa mediante ensayos de bioluminiscencia en presencia de luciferina y ATP, empleando el kit comercial Luciferase Assay System de Promega. Además, se corrobora la presencia del material genético introducido mediante RT-PCR para la amplificación específica de una región del mRNA de luciferasa y medir expresión de mRNA del reportero. Detección de la expresión de GFP mediante ensayos de microscopia.

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

El OMG no se encuentra en el medio ambiente por lo que no hay necesidad de su aislamiento.



VI. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1. Descripción de la actividad. (Breve resumen de los ensayos que se prevén realizar, incluidos los que se llevarán a cabo con el OMG).

Los parásitos que portan el reportero luciferasa (*Firefly luciferase*) se emplearán para evaluar la actividad promotora de secuencias propias del parásito (secuencia Pr77 portando mutaciones puntuales a lo largo de la secuencia). Para ello, se medirá la expresión de mRNA luciferasa mediante las metodologías anteriormente descritas. Esperamos identificar regiones en secuencias de *T. cruzi* implicadas en la activación de la transcripción y procesos de regulación génica. La cepa transformada expresa el gen reportero luciferasa (*Firefly luciferase*) de forma funcional. Para ello, los análisis llevados a cabo son los siguientes:

i. **Secuenciación:** para corroborar que la secuencia de la construcción a transfectar era correcta, se llevó a cabo la secuenciación de dicha construcción usando oligos que mapean en el plásmido.

ii. **Transcripcionales:** para determinar la expresión de mRNA luciferasa, se llevaron a cabo ensayos de *northern-blot* y RT-PCR usando RNA total extraído de cultivos transfectados de formas epimastigotes de *T. cruzi*. En el caso del *northern-blot*, se usaron sondas radiactivas (marcadas internamente con α ATP32) que hibridan en la región codificante del reportero. Y para la RT-PCR, se usaron oligos específicos tanto para la síntesis de cDNA como para la amplificación posterior por PCR.

iii. **Traduccionales:** para determinar la expresión del reportero a nivel de proteína, se llevó a cabo un ensayo de medida de la luminiscencia emitida debida a luciferasa.

2. Información sobre el volumen o cantidad de OMG a utilizar:

a. Volumen o concentración máxima por ensayo en el caso de microorganismos.

i) Para preparación de lotes

~ 1×10^9 parásitos (como máximo).

ii) Para Inoculaciones. Método de inoculación *in vitro*/ *in vivo*:

No se llevarán a cabo

b. Número aproximado de plantas por ensayo:

c. Número aproximado de animales por ensayo:

3. Naturaleza de las operaciones:

a. Enseñanza

b. Investigación

c. Desarrollo

4. 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 asociados las actividades con los OMG).

Está previsto que dichas actividades sean realizadas para septiembre-octubre de 2023 y que los transformantes se analicen en los dos meses siguientes en el marco del proyecto que se menciona:

Título: “Avances en el conocimiento inmunológico y molecular para el control de la enfermedad de Chagas”.

Entidad financiadora: AEI-MINECO; Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad (Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación).

Referencia: PID2019-109090RB-I00 (1/06/2020- 31/05/2024).

IP: M.C. Thomas & M.C. López.

VII. EVALUACIÓN DE RIESGO

Se tendrán en cuenta los elementos y el procedimiento conforme al Anexo I del Real Decreto 178/2004 de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, 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. Identificar cómo pudieran afectar las posibles propiedades nocivas del organismo receptor, donante, inserto y vector al OMG que se va a generar:

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

- a. Organismo receptor.

El OMG generado no tienen más propiedades nocivas que las propias del organismo receptor, Trypanosoma cruzi

- b. Organismo donante.

Photynus pyralis y Aequorea victoria no poseen propiedades nocivas

- c. Inserto.

Secuencias de interés de *Trypanosoma cruzi* (elementos genéticos móviles) y secuencia del gen reportero luciferasa de luciérnaga (*Photynus pyralis*) o GFP de *Aequorea victoria* no poseen propiedades nocivas y no afecta a las propiedades nocivas del OMG.

- d. Vector.

Plásmido comercial pTEX (<https://www.addgene.org/vector-database/4365/>) no posee propiedades nocivas)

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG⁵

- a. Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

⁵. Si se considera que no tienen efectos adversos para la salud y el medio ambiente, también hay que justificarlo.



Es un organismo patógeno, aunque la forma a utilizar (epimastigote) NO ES INFECTIVA.)

b. Efectos para el medio ambiente.

3. Descripción de las fases críticas de los ensayos en cuanto a bioseguridad):

Cultivo, electroporación y extracción de DNA, RNA y lisados de proteínas totales. Más en detalle, la forma epimastigote de *T. cruzi* (forma unicelular no infectiva) se cultivará in vitro en instalaciones con nivel de bioseguridad NCB3 del IPBLN. Todo el personal será entrenado a tal efecto para cumplir con la normativa actual vigente en la instalación, en cuanto a la manipulación de otros microorganismos tipo 3. Para el cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*, se trabajará en frascos de cultivo no ventilados. Para los diversos análisis moleculares a realizar (anteriormente descritos), los parásitos se recolectarán mediante centrifugación y lisarán con NP40 y SDS en el interior de la cabina de seguridad biológica clase II para obtener la fracción citoplasmática y de ahí purificar el mRNA y/o el extracto proteico.

4. Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse en las diferentes fases:

Todo el trabajo relativo a manipulación del OMG, se llevará a cabo en la instalación de biocontención NCB3 del IPBLN, autorizada con nº de notificación A/ES/19/I-17. El trabajo con parásitos vivos se realiza siempre en cabinas de seguridad biológica de clase II. Los tubos u otros contenedores que contengan parásitos vivos no pueden abrirse fuera de la cabina. Se deben utilizar doble guantes protectores y batas hidrófobas siempre que se manejen parásitos vivos. Si es necesario centrifugar, se utilizan tubos sellados y en centrifugas con cestillos de seguridad. Está prohibido el uso de objetos que puedan ser cortantes o punzantes (vidrio o metal).

VIII. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA⁶

1. Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

-El personal autorizado deberá entrar con ropa y calzado exclusivos siguiendo los protocolos de trabajo diseñados en dicha instalación.

- Se prestará especial atención para evitar la contaminación a través de la piel, por lo que es obligatorio llevar guantes cuando se manipule el material.

-Está prohibido el uso de objetos cortantes o punzantes en los procedimientos con los organismos vivos.

- Todos los residuos del laboratorio deben ser descontaminados adecuadamente antes de su eliminación.

⁶ En el caso de que la actividad se realice en una instalación ya autorizada, se deberán describir las medidas de protección adicionales a las descritas en el formulario B que se presentó en la solicitud para la autorización de la instalación, teniendo en cuenta el riesgo específico de la actividad.



Se prestará especial atención para evitar la contaminación a través de la piel, por lo que es obligatorio llevar guantes cuando se manipule el material.

-Está prohibido el uso de objetos cortantes o punzantes en los procedimientos con los organismos vivos.

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

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

3. Descripción de la información y formación suministrada a los trabajadores:

Para poder trabajar en esta salas, se deberá comunicar al responsable de Seguridad Biológica el tipo de agente biológico con el que van a trabajar, así como los posibles riesgos que puede implicar su manipulación.

- El acceso a estas salas está restringido a personal autorizado y debidamente adiestrado para ello mediante una formación teórica y práctica de los protocolos y procedimientos de trabajo diseñados para trabajar en esta instalación. Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17

4. Planes de emergencia y contingencia:

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