



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

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

I. INFORMACIÓN GENERAL

A. Notificador

1) Nombre y titulación del responsable de la notificación:

Dr. Pablo Gastaminza Landart.
Doctor en Biología Molecular.

2) Centro, Institución o Empresa:

Centro Nacional de Biotecnología
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

3) Domicilio:

c/ Darwin 3
Cantoblanco
28049 - Madrid

4) Persona de contacto:

Fernando Usera Mena
Responsable del Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica

Tel: 915854541
Fax: 915854506
Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es



B. Instalación donde se va a desarrollar la operación de utilización confinada (sí previamente ha sido comunicada para este tipo de operaciones):

- 1) Fecha de comunicación de la notificación relativa a la instalación: **7/03/2001**
- 2) Número de Notificación: **A/ES(00/I-8**

C. Información sobre el personal y su formación (Titulación y experiencia en el sector):

1) Responsable de la actividad de utilización confinada objeto de la notificación:
Dr. Pablo Gastaminza Landart. Doctor en Biología Molecular. Trece años como investigador en el campo de la virología, especializado patógenos humanos: virus de la gripe y de la hepatitis C. Ha contribuido al desarrollo de un sistema de infección en cultivo celular similar al que se presenta en esta solicitud por lo que posee amplia experiencia (5 años) con el manejo de HCV recombinante.

2) Responsables de la vigilancia y/o control (sólo en el caso que sean diferentes que los notificados para el caso de las instalaciones):

Fernando Usera Mena, Doctor en Ciencias. Investigador Titular de Organismos Públicos de Investigación. Responsable del Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica del CNB desde 1993.

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:
Producción segura de virus infecciosos recombinantes de la hepatitis C (HCV) a partir de cDNAs clonados con objeto de estudiar aspectos básicos de la biología de HCV, incluyendo los factores celulares y virales que regulan la infección por HCV en cultivo celular. Se empleara para ello la cepa H77S. Dichos genoma está basado en una cepa aislada de pacientes que han sufrido modificaciones genéticas para adaptarlas a cultivo celular "in vitro", ya que las cepas silvestres de HCV obtenidas de pacientes no replican eficazmente en cultivo celular. Las modificaciones genéticas descritas en detalle en el Apartado V de la presente solicitud han sido generadas en otro laboratorio y los virus resultantes han sido previamente caracterizados (Anexo 1). Dicha publicación indica que los virus modificados presentan la inusual capacidad propagación en cultivo celular in vitro gracias a las mutaciones introducidas. El objeto de este documento es el de comunicar las actividades relacionadas con la manipulación del virus mencionado en cultivo celular.

2) Clasificación de la actividad conforme al artículo 5 y Anexo III de la Directiva 98/81/CE y Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre:



- Tipo 1
Tipo 2
Tipo 3
Tipo 4

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

- 1) Nombre científico: Virus de la hepatitis C.

Taxonomía: Flaviviridae, genero Hepacivirus

Nombre común: HCV

- 2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

El HCV tiene un tropismo exclusivamente humano. El virus se encuentra en el hígado y circulando en sangre de pacientes infectados. El virus como tal no puede ser aislado de pacientes si no es en forma de cDNA generado por RT-PCR a partir del genoma de RNA viral de sangre infectada, ya que cepas silvestres de HCV no son capaces de replicar en cultivo celular y por lo tanto no se pueden realizar cultivos primarios de HCV para aislar e identificar el virus.

b) Técnicas de identificación:

Existen herramientas diagnósticas comerciales que determinan la presencia de HCV en pacientes basadas tanto en la seropositividad (presencia de anticuerpos frente al virus) así como técnicas moleculares basadas en la amplificación del genoma de RNA viral por RT-PCR cuantitativa a partir de sangre de individuos infectados. Ambas técnicas se emplean rutinariamente en clínica.

c) Marcadores genéticos:

Se dispone de secuencias completas de cientos de aislados de HCV en las bases de datos (<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/ToolsOutline.html>). Si bien existen al menos 6 genotipos de HCV a su vez subdivididos en diferentes subgenotipos, existen secuencias conservadas en áreas del genoma viral que permiten amplificar por RT-PCR los genomas virales. Para ello pueden emplearse los siguientes *primers*.

HCV_{up}
5' TCTGCGGAACCGGTGAGTA 3'

HCV_{low}
5' TCAGGCAGTACCACAAGG 3'



d) Marcadores fenotípicos:

Los pacientes infectados presentan viremia (presencia de RNA viral en sangre). La infección crónica por HCV se caracteriza por las alteraciones hepáticas (elevación de transaminasas en sangre, hepatoesteatosis) e inmunológicas (linfoma, crioglobulinemia).

e) Estabilidad genética:

Los virus de la hepatitis C poseen un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. Dicho genoma se amplifica mediante la actividad de una RNA polimerasa dependiente de RNA. La fidelidad de estas RNA-polimerasas virales es muy baja y producen típicamente alrededor de un cambio de nucleótido por genoma. Por lo tanto, existe una población diversa de cuasiespecies con pequeñas alteraciones genéticas circulando en un mismo paciente.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

No se conocen.

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor o parental?

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:

El virus de la hepatitis C es un patógeno que infecta exclusivamente a humanos y, experimentalmente, a chimpancés a través de la inoculación de material biológico contaminado (principalmente sangre y hemoderivados). No existe zoonosis alguna y el virus se transmite principalmente por sangre contaminada.

6) Si el organismo receptor o parental 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.):

El virus de la hepatitis C ha sido asignado al grupo de riesgo 3. No obstante la Directiva 2000/54/CE también indica que el riesgo de infección se encuentra limitado al personal expuesto puesto que no son infecciosos a través de aerosol.

a) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

La infección crónica por el virus de la hepatitis C causa una inflamación hepática crónica de desemboca en fibrosis, cirrosis y, en un fracción importante de los infectados, en carcinoma



hepatocelular. No existe vacuna eficaz frente a HCV. El tratamiento actual, interferón+ribavirina, es caro, sólo parcialmente eficaz y asociado con importantes efectos adversos.

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

SI NO

Por qué: Se desconocen las bases moleculares que determinan el grado de patogenicidad.

- 6) La cepa/línea celular receptora o parental: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?
Si. Se trata de DNA recombinante a partir del cual se genera virus infeccioso. Las células Huh-7 no pueden ser infectadas con cepas de campo y su susceptibilidad se encuentra limitada a las cepas adaptadas a cultivo celular.

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

El solicitante cuenta con más de 13 años de experiencia en manipulación de virus patógenos humanos en cultivo celular, incluyendo estudios de genética reversa y patogénesis, primero con el virus de la gripe y actualmente con el virus de la hepatitis C. El solicitante es autor de uno de los trabajos que permitió el desarrollo de un sistema de infección para HCV en cultivo celular (ver Anexo 2), con el que viene trabajando desde que este sistema existe. Se adjunta dicho manuscrito para reiterar que el solicitante no es ajeno a la manipulación de virus recombinantes de la hepatitis C, ni al riesgo asociado a su manipulación. Los procedimientos descritos en el apartado VII-Descripción de las operaciones se basan en los procedimientos descritos en el Anexo 1. Cabe destacar que solicitante no trata de rescatar un virus nuevo, con propiedades desconocidas, sino el de recibir autorización para desarrollar actividades que el solicitante viene desarrollando fuera de España desde hace 5 años.

- 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?:
La supervivencia del virus fuera del medio de cultivo es muy baja.

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) virus
- viii) otros, especifíquese

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

El virus no es capaz de sobrevivir fuera de la sangre o del medio de cultivo, es muy sensible a detergentes y a isopropanol ya que tiene una envuelta lipídica. También es sensible a la inactivación por temperatura: el virus es inestable cuando es incubado incluso a 37°C (infectividad 100 veces menor en 24 horas). y son suficientes 10 minutos a 60°C para inactivar completamente las muestras infecciosas.

d) Posibles nichos ecológicos:

Infección limitada a humanos y chimpancés. El virus se transmite esencialmente por vía sanguínea por lo que la propagación espontánea del virus en el medio es virtualmente inexistente. Se sospecha que la propagación del virus se ha venido produciendo principalmente por infección iatrogénica por transfusión de sangre contaminada. Actualmente la población de mayor riesgo, además del personal sanitario y pacientes que requieren transfusión sanguínea o diálisis, es la de los toxicómanos que consumen drogas por inyección intravenosa así como personal sanitario expuesto a material infeccioso. La eventual liberación accidental al medio de este patógeno no supondría un peligro biológico inmediato. En caso de infección adquirida por el personal expuesto, no existe peligro inmediato de propagación al medio.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica.

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

No aplica.

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

No aplica.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

En pacientes co-infectados con HIV se ha descrito una exacerbación de los síntomas de la hepatitis así como una eficacia reducida del tratamiento estándar frente a HCV.

No existe posibilidad de intercambio de material genético entre los virus recombinantes y otros organismos o entre ellos de forma espontánea.



11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:
El virus infecta a humanos y no se conoce ningún reservorio en el medio ni zoonosis alguna, por lo que su distribución geográfica coincide con la de la población humana.

12) Hábitat natural del organismo:
Población humana (3% de la población mundial se encuentra infectada persistentemente).

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico:
Virus de la hepatitis C
Taxonomía: Familia: *Flaviviridae*;
Género: Hepacivirus. Cepa H77 genotipo 1a
Nombre común: H77

2) Tipo de material genético utilizado para la transformación:
cDNAs de cepas virales obtenidas de pacientes infectados.

3) Función prevista del material genético utilizado en la modificación genética:
Las modificaciones introducidas en H77 permiten la producción de virus infeccioso en cultivo celular.

4) ¿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 crónica por el virus de la hepatitis C causa una inflamación hepática crónica. Sin embargo, las cepas resultantes de las modificaciones genéticas descritas presentan una adaptación específica al crecimiento en cultivo celular, lo que reduce su patogenicidad y aumenta la seguridad en su manipulación.



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

En el caso de las secuencias derivadas del virus de la hepatitis C, las secuencias insertadas son esenciales para la replicación del virus y, por lo tanto, para su patogenicidad. Si embargo, las combinaciones de secuencias insertadas dan lugar a una adaptación específica al crecimiento en cultivo celular, lo que probablemente reduce su patogenicidad y aumenta la seguridad en su manipulación.

- 8) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?
No.

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

- 1) Tipo de modificación genética:

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

- 4) Finalidad de la modificación genética:

El genotipo parental H77 ha sido modificado para obtener la cepa H77S adaptada a cultivo celular. Las mutaciones descritas permiten incrementar la tasa de multiplicación del RNA en cultivo celular lo que a su vez permite la producción de virus infeccioso, si bien a títulos extremadamente bajos (100 partículas infecciosas por ml :100 FFU/ml).

- 5) Método utilizado para llevar a cabo la modificación genética:

Técnicas de biología molecular estándar para manipulación de ADN recombinante, ya que el genoma viral se manipula como cDNA clonado en plásmidos.

El cDNA **H77** fue clonado en un vector basado en pUC a partir de suero de un paciente infectado con HCV del genotipo 1a (H77). Posteriormente, se introdujeron mutaciones puntuales en las posiciones Q1067R, G1188R, P1496L, F2080V y K2040R que confieren la capacidad de replicar activamente en células en cultivo dando lugar al genotipo **H77S**.

Este cDNA es posteriormente transcrito in vitro empleando para ello polimerasa del fago T7 comercial (Ambion). El RNA viral purificado resultante será transfectado por electroporación en células Huh-7. Una vez introducido en la células diana, el RNA viral es traducido a proteína. Las proteínas virales forman complejos de replicación que darán lugar a genomas progenie y a la producción de viriones en el sobrenadante que serán almacenados a -80°C. Dichos sobrenadantes serán empleados para propagar la infección en células Huh-7 para producir stocks de virus que serán empleados en diversos experimentos.



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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

Para el H77S se ha empleado un vector basado en pUC19 (Universidad de California).

b) Dimensiones del vector (pares de bases):

pUC19 (2686 bp)

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):

Ver Anexo 3.

d) Gama de hospedadores del vector:

E.coli

e) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

No tiene

ii) Si el vector es un bacteriófago, un cósmido o un fásmid, ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas? No aplica

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

El vector se emplea exclusivamente in vitro y no se transfiere a las células humanas receptoras. Sólo se transfiere el ARN viral que no tiene capacidad para integrarse en el genoma de las células receptoras. Además el ciclo vital del virus es exclusivamente citoplásmico, reduciendo aún más la remota capacidad de integración.

5) Información del inserto:



a) Dimensiones del inserto, mapa de restricción y secuencia:
Ver Anexo 3

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

El inserto constituye un genoma completo del virus de la hepatitis C correspondiente al genotipo 1a (Cepa H77S) clonados a partir de ARN aislado por RT-PCR de suero de pacientes infectados. Los elementos principales de estos genomas son:

-Secuencias no codificantes 5' (5'UTR): secuencias de ARN viral esenciales para la replicación y traducción del genoma. Incluye un elemento IRES que permite la traducción del genoma de forma independiente de estructuras cap, típicas de mensajeros celulares.

-Secuencia codificante: Codifica la poliproteína viral que es procesada por proteasas celulares y virales para dar lugar a todas las proteínas virales:

.core: proteína de la cápside.

.E1/E2: complejo de la glicoproteína de la envuelta.

.p7: viroporina de HCV, implicada en el ensamblaje de partículas virales

.NS2: Proteasa viral implicada en el ensamblaje de partículas virales.

.NS3: Proteasa/Helicasa viral con función en la replicasa y como antagonista de la respuesta inmunitaria innata.

.NS4A: Componente de la replicasa.

.NS4B: Componente de la replicasa.

.NS5A: Componente de la replicasa con funciones esenciales para el ensamblaje de viriones.

.NS5B: Polimerasa viral.

-Secuencias 3'UTR: Secuencias de ARN no codificante esenciales para la replicación-traducción del virus.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

La mutagénesis del ADN complementario (cDNA) incluye los siguientes pasos:

Mutagénesis del fragmento de interés mediante PCR con oligonucleótidos que incluyen los cambios deseados.

Fragmentación: La preparación de los fragmentos para la clonación se obtiene por digestión con enzimas de restricción y purificación mediante electroforesis en gel de agarosa o cromatografía con columnas.

Ligación: Consiste en la inserción del fragmento (cDNA) en un vector. Para ello, el vector (que generalmente es circular) se convierte en una secuencia lineal (mediante digestión con enzimas de restricción), y se incuba con el fragmento que contiene el gen de interés en presencia del enzima ADN ligasa.

Transcripción: El cDNA completo se convierte en una secuencia lineal (mediante digestión con enzimas de restricción) y se emplea como molde para la transcripción in vitro a ARN.

Transfección: El ARN viral se transfecta por electroporación en las células diana. En el medio de cultivo de estas células se liberan los viriones. Por tanto, utilizaremos este sobrenadante para infectar posteriormente las células en estudio.

d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto:

Indicada en el apartado relativo al organismo receptor.



e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:
No existen elementos reguladores en el inserto.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?
Si. Ver Anexo 3.

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.
La mayoría de las funciones de las proteínas virales a estudio se conoce aunque pueden existir funciones adicionales no descritas previamente. El virus y las proteínas virales *per se* son objeto de estudio.

VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre? Si.

En caso afirmativo:

i) Número de copias

El número de copias de cada uno de los genes en el vector es 1.

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

Si

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares? No

En caso afirmativo:

i) número de copias:



ii) localización cromosómica:

iii) secuencias laterales:

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

c) Si se trata de un virus:

- i) Es defectivo
- ii) Es potencialmente inducible

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 (síntesis de niveles de mRNA)
- iii) Traduccionales (síntesis de niveles de proteínas)

Aportar toda la documentación al respecto.

Esta información ha sido publicada en el trabajo original descrito en el Anexo 1 . En dicho trabajo se describen además de los procedimientos de mutagénesis, la caracterización de: 1) la capacidad replicativa del genoma mutante mediante PCR semicuantitativa, 2) su capacidad de expresar las proteínas virales mediante Western-Blot y 3) de producir partículas virales que propagan la infección en cultivo celular mediante técnicas virológicas clásicas.

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

El organismo receptor presenta mutaciones que permiten la propagación del virus en cultivo celular.

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 cepa que se presenta han adquirido la capacidad de multiplicarse en células en cultivo, propiedad de la que carecen los genotipos parentales de las que proceden.

c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese: No

d) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese: No

e) Marcadores específicos del OMG:

Los virus resultantes tienen una secuencia conocida (Anexo 3) que puede ser analizada mediante RT-PCR y secuenciación, empleando para ello primers específicos. Al disponerse de cDNAs completos pueden asimismo generarse sondas específicas para detectar el ARN viral mediante Northern Blot.

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

Los plásmidos utilizados y las células diana tienen una alta estabilidad genética. El virus generado a partir del ARN viral presenta una estabilidad genética alta, si bien la baja fidelidad de la ARN-polimerasa viral genera un número significativo de mutantes puntuales si es propagado de forma prolongada en cultivo celular. Para evitar esta deriva genética, típica de los virus con genoma de ARN, se utilizarán virus que han sufrido un número de pases menor a 3, tras lo que se volverá a producir un virus monoclonal con secuencia conocida a partir del cDNA clonado, tal y como se describe anteriormente.

4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos:
La probabilidad es extremadamente baja, virtualmente imposible.

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

6) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.

a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG.

El OMG se identificará al final del proceso. Se infectarán las células de mamífero con el sobrenadante de las células transfectadas con el ARN viral que contiene los viriones, y en estas células se comprobará si se han producido viriones de HCV mediante tres técnicas principales:



- 1- RT-PCR (Reverse Transcriprion-Polymerase Chain Reaction), empleando oligonucleótidos específicos para cada uno de los virus.
- 2- WB (Western Blotting): utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas codificadas por HCV (core y NS5A)
- 3- Inmunofluorescencia: utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas codificadas por HCV (core y NS5A)

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

El OMG no puede sobrevivir en el medio ambiente, por tanto no son necesarias.

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

- | | | |
|------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| a) Enseñanza | <input type="checkbox"/> | Volumen máximo: |
| b) Investigación | <input checked="" type="checkbox"/> | Volumen máximo: 50ml por ensayo |
| c) Desarrollo | <input type="checkbox"/> | Volumen máximo: |

2) Periodo propuesto para la utilización confinada: Se prevé un periodo mínimo de 5 años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada.

3) Finalidad de la actividad de utilización confinada, incluidos los resultados esperados: Producción de virus de la hepatitis C infeccioso para estudiar aspectos básicos de la infección por este patógeno humano, incluyendo los factores celulares y virales que regulan su replicación en cultivo celular.

4) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro Centro, y si es así, si dicho Centro está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG:
El OMG será generado en el CNB a partir de plásmidos que contienen el cDNA correspondiente a los genotipos anteriormente descritos. Por lo tanto el OMG no procede de otro centro.
El plásmido correspondiente a H77S proviene de Universidad de Texas (Galveston, Texas-USA).

5) 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, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

¹ Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:



No se prevé el transporte de OMGs

6) 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 procedimientos descritos a continuación se basan en la metodología descrita en los Anexos 1 y 2.

Producción de virus infeccioso a partir de cDNA clonado:

Células de hepatoma humano (Huh-7; 4 millones) serán transfectadas con 10 µg de ARN viral transcrito in vitro en el laboratorio P3 donde serán cultivadas a 37°C en un volumen máximo de 20 ml en "flasks" de 162 cm² con filtros incorporados en los tapones. Las muestras de células infectadas serán monitorizadas para determinar la producción de partículas infecciosas en su sobrenadante por dilución límite en células no infectadas e inmunofluorescencia o western-blot. Aliquotas de los sobrenadantes se guardarán a -80°C y se emplearán para experimentos de infección.

Infección de células de hepatoma humano (Huh-7) con el virus recombinante H77S para producción de stocks:

Células Huh-7 o derivadas (2 millones en 20 ml-flask de 162cm²) serán infectadas a baja multiplicidad (moi 0.01). Las células se mantendrán en cultivo durante 10 días, siendo pasadas las células los días 3 y 6 postinfección. Los sobrenadantes se filtrarán a través de filtros de 0.45 µm y se guardarán alícuotas de 5 ml a -80°C.

Infecciones en distintas condiciones experimentales:

Los stocks anteriormente descritos serán empleados para inocular células Huh-7 (típicamente en multipocillos M6) a distintas multiplicidades siendo el volumen máximo por placa inferior a 20 ml. Dichas placas multipocillo serán incubadas en un contenedor secundario dentro de los incubadores a 37°C durante distintos periodos de tiempo en función de cada experimento. Las fases críticas de estos ensayos implica la manipulación de material infeccioso (sobrenadantes y células infectadas), manipulación que tendrá lugar dentro de la cabina de bioseguridad, siguiendo las normas propias del P3. La manipulación de dichas muestras fuera de la cabina se ceñirá exclusivamente a recipientes cerrados y confinados en contenedores secundarios para su centrifugación y almacenamiento. Toda muestra que deba ser procesada fuera del P3 será adecuadamente inactivada con agentes caotrópicos (4M isotiocianato de guanidina), fenol, detergentes iónicos (1% SDS) o paraformaldehído (4% en PBS- 20 min-fijado de células infectadas) antes de proceder a su manipulación fuera del P3, tras esterilizar las superficies exteriores de los tubos o placas de cultivo que llevan la muestras inactivadas.

-
- **(ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas)** del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera (http://www.adr-digital.com/adr/adr1999/A2C62_MM99.pdf) y principales modificaciones: (ADR) versión 2005, **Clase 6.2 y Clase 9** (http://www.adr-digital.com/adr/adr2005/adr_2005.htm)
 - Reglamento (CE) nº 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) nº 1255/97.
 - Reglamento (CE) nº 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:
Decisión BS-I/6 (<http://www.biodiv.org/biosafety/cop-mop/result.aspx?id=8288&lg=1>)



7) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse incluida la información relativa a la gestión de los residuos (tratamiento, forma y destino final):

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 "Biomaste" 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.

8) Resultados previstos:

Se preve obtener virus infecciosos de la hepatitis C adaptados a cultivo celular que infecten y se propaguen en células de hepatoma humano (Huh-7).

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 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

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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Las normas a seguir serán las expuestas en el reglamento de funcionamiento del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica incluido en la solicitud de autorización.

2) Formación del personal adscrito:

El personal adscrito ha recibido la formación e información indicada en “Descripción de la información suministrada a los trabajadores”, apartado que se adjuntó a la documentación para la solicitud de autorización del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica.

Todo el personal implicado tiene experiencia en la manipulación de los agentes biológicos que se indican en esta solicitud y su formación académica es licenciatura o doctorado.



3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Viene descrito en el apartado 6.F del reglamento de funcionamiento de la instalación que se incluyó en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

Vienen descritos en los apartados 6.B, 6.C, 6.D y 6.G. del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Vienen descritos en el apartado 6.D. del Reglamento de funcionamiento de la instalación y más específicamente en "Procedimientos y planes de comprobación de la eficacia permanente de las medidas de confinamiento".

Esta información se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio Además el servicio de seguridad biológica velará por el cumplimiento de las normas de control de acceso, manipulación, descontaminación, esterilización, sanitización, etc. según se indica en diferentes apartados del citado Reglamento.

6) Gestión de residuos (describir el sistema utilizado para cada tipo de residuo y quien lo lleva a cabo- contratación de empresa gestora, en su caso):

Todo lo concerniente a la gestión de los residuos generados se especifica en los apartados 4.F y 6.H del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

7) Inactivación de residuos (método, forma final, destino):

Todo lo concerniente a la gestión de los residuos generados se especifica en los apartados 4.F y 6.H del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

X. 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 OPERACIONES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE (Ver NOTA (1))**

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

A. Notificador

1. Nombre del Centro, Institución o Empresa:

**Centro Nacional de Biotecnología
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**

2. Domicilio del notificador:

**Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).
c/ Darwin 3
28049 - Madrid**

3. Responsable de la actividad de utilización confinada:

Dr. Pablo Gastaminza Landart
Doctor en Biología Molecular

Tel: 91 5854561
Fax: 91 585 4506
Correo electrónico: pgastaminza@cnb.csic.es

Firma del notificador



B. Descripción de la actividad.

1. Objetivo de la actividad:

Producción segura de virus infecciosos recombinantes de la hepatitis C (HCV) a partir de cDNAs clonados con objeto de estudiar aspectos básicos de la biología de HCV, incluyendo los factores celulares y virales que regulan la infección por HCV en cultivo celular. Dichos genomas están basados en cepas aisladas de pacientes que sido alteradas genéticamente para adaptarlos a cultivo celular, ya que los aislados clínicos de HCV no replican eficazmente en cultivo celular.

2. Duración de la actividad:

Se prevé un periodo mínimo de 5 años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada.



Evaluación de riesgo (Ver NOTA (2))

1. Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del: (Ver NOTA (3))

1.1. Organismo receptor.

El virus de la hepatitis C es un patógeno humano que infecta un 3% de la población mundial. La infección crónica por este virus produce inflamación prolongada del hígado dando lugar a fibrosis, cirrosis y en muchos casos, carcinoma hepatocelular. Se trata de un patógeno que se trasmite fundamentalmente por vía sanguínea siendo el personal inmediatamente expuesto a material infectado el que se enfrenta al mayor riesgo. No se transmite por aerosol y su supervivencia fuera del hospedador es muy limitada.

1.2. Organismo donante.

La cepa H77 contiene secuencias derivadas exclusivamente del virus de la hepatitis C de aislados clínicos. y son portadores de mutaciones que permiten su replicación en cultivo celular.

1.3. Inserto.

El inserto consiste en un genoma completo del virus de la hepatitis C del genotipo 1a y es portador de mutaciones que permiten su replicación en cultivo celular. Contiene todos los elementos estructurales y funcionales para la producción de viriones infecciosos. Tiene por lo tanto un potencial semejante al descrito para el “organismo donante”.

1.4. Vector.

Los vectores empleados contienen las secuencias mínimas para la propagación de los plásmidos en E.coli y conferir resistencia a ampicilina a las bacterias portadoras del plásmido. Contienen además los promotores de las ARN-polimerasas de los fagos T7 y T3 para permitir la transcripción del inserto in vitro. El ARN viral no se puede expresar en células de mamífero a partir del plásmido por lo que tiene que ser transcrito in vitro antes de ser introducido por electroporación en las células diana.

1.5. Organismo modificado genéticamente resultante.

El organismo resultante es un virus de la hepatitis C (H77S) adaptado a cultivo celular. Las modificaciones introducidas permiten que cepas de este virus, que no replican en cultivo celular, lo hagan eficazmente en células de hepatoma humano (Huh-7). Los virus modificados resultan de la transfección del ARN viral producido por transcripción in vitro de los plásmidos correspondientes en células de hepatoma humano (Huh-7).

Se empleara para ello la cepa H77S. Dichos genoma está basado en cepas aisladas de pacientes que han sufrido modificaciones genéticas para adaptarlas a cultivo celular “in vitro”, ya que las cepas silvestres de HCV obtenidas de pacientes no replican eficazmente en cultivo celular. Las modificaciones genéticas descritas en la presente solicitud han sido generadas en otro laboratorio y los virus resultantes han sido previamente caracterizados (Anexo 1). Dicha publicación indica que los virus modificados presentan la inusual capacidad propagación en cultivo celular in vitro gracias a las mutaciones introducidas. El objeto de este documento es el de comunicar las actividades relacionadas con la manipulación del virus mencionado en cultivo celular.

1.5.1 Efectos para la salud humana.

Los virus producidos tienen un potencial patogénico semejante al de cualquier virus de la hepatitis C ya que poseen todos los elementos que permiten su propagación. Sin embargo, la infección por estos virus es improbable en el entorno del laboratorio. De hecho, se calcula que solamente un 1.8% de las personas que han sufrido inoculación



accidental con jeringas contaminadas con HCV de pacientes resultan infectadas. Esta situación no debería darse en el entorno del P3 donde no se empleara material punzante. No obstante, existe un peligro potencial limitado al personal directamente expuesto, peligro cuya relevancia se ve incrementada por la falta de una vacuna y de una terapia eficaz frente a este virus.

1.5.2 Efectos para el medio ambiente.
No aplica.

Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente: (Ver NOTA (4))

Tipo 1	<input type="checkbox"/>
Tipo 2	<input type="checkbox"/>
Tipo 3	<input checked="" type="checkbox"/>
Tipo 4	<input type="checkbox"/>

2. Probabilidad de que se produzcan efectos nocivos y gravedad de los mismos, en función de: (Ver NOTA (5))

3.1. Características de la actividad (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.

3.2. Concentración y escala utilizadas.

La concentración máxima empleada será de 10^2 ffu (unidades infecciosas)/ml de cultivo. Los experimentos suelen alcanzar un máximo de unos 50 ml por experimento, siendo el formato más habitual el de placas multipocillo M6 (35 mm de diámetro- 3ml de medio de cultivo) o menores.

3.3. 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).

El rescate de virus recombinantes se realizará en células Huh-7 empleando para su cultivo frascos con tapón de filtro o, en caso de emplear placas multipocillo, se emplearán contenedores secundarios con filtro, todo ello introducido en cajas resistentes a prueba de caída. Los experimentos de transfección y de infección se realizarán en el laboratorio de contención biológica de nivel 3, por lo que el personal y el entorno expuestos se reducen 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 con material infeccioso se prevé una probabilidad muy baja de adquisición de la infección, dada la estadística observada en personal sanitario inoculado accidentalmente con material infeccioso (1.8% adquieren la infección). Sin embargo este supuesto es prácticamente imposible ya que está prohibido el uso de material cortante o punzante en el laboratorio. En el caso altamente improbable de adquisición de la infección, dada la probable atenuación de los genotipos manipulados, es posible que curse con una patogénesis reducida.

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: (Ver NOTA (6))

5.1. 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.

- 5.2. 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.
- 5.3. Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales.
Viene indicado en el Plan de emergencias y evacuación incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.
- 5.4. Planes de emergencia.
El Plan de emergencias y evacuación del laboratorio se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

NOTAS al Modelo de Evaluación de riesgo de operaciones de utilización confinada de organismos modificados genéticamente



- (1) Para la elaboración de la evaluación de riesgo de la actividad propuesta se tendrá en cuenta toda la información suministrada, en su caso, en el formulario relativo a la Notificación de Operaciones con organismo modificados genéticamente (Parte A), así como el relativo a la Notificación de Instalaciones donde se realizan operaciones con organismos modificados genéticamente (Parte B).
- (2) Para llevar a cabo dicha evaluación se tendrá en cuenta el procedimiento establecido en el Anexo III de la Directiva 98/81/CE, de 26 de octubre de 1998 y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo descrita en el Anexo III de la Directiva 98/81/CE.
- (3) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.
- (4) Para establecer esta primera valoración se tendrá en cuenta lo dispuesto en el artículo 5.3 de la Directiva 98/81/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).
- (5) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.
- (6) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.