

Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares

Biological risk: Assessment and prevention in tasks with cell cultures
Risque biologique: Evaluation et prévention aux travaux avec des cultures cellulaires

Redactora:

Asunción Mirón Hernández
Licenciada en Biología

CENTRO NACIONAL DE NUEVAS
TECNOLOGÍAS

En esta nota técnica de prevención se revisa de forma esquemática las características del trabajo con cultivos celulares, contemplando los principales factores de riesgo y las principales medidas preventivas y de contención requeridas para su manipulación.

Las NTP son guías de buenas prácticas. Sus indicaciones no son obligatorias salvo que estén recogidas en una disposición normativa vigente. A efectos de valorar la pertinencia de las recomendaciones contenidas en una NTP concreta es conveniente tener en cuenta su fecha de edición.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente los cultivos celulares son ampliamente utilizados en la industria de la biotecnología para la producción de vacunas, enzimas, anticuerpos monoclonales, proteínas, etc. También son útiles en distintas disciplinas de la investigación biomédica como: citología, virología, inmunología, investigación sobre el cáncer, embriología, estudios cromosómicos y tratamientos médicos entre los que cabe destacar el mantenimiento y producción de tejidos para trasplantes.

Desde el punto de vista preventivo, los cultivos celulares son considerados agentes biológicos según la definición recogida en el Artículo 2 del Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, en la que se considera: “Agentes biológicos: microorganismos, con inclusión de los genéticamente modificados, cultivos celulares y endoparásitos humanos, susceptibles de originar cualquier tipo de infección, alergia o toxicidad”, y “Cultivo celular: el resultado del crecimiento *in vitro* de células obtenidas de organismos multicelulares”. Por lo que, en las actividades que implican la utilización o manipulación de estos cultivos se deberán adoptar medidas para proteger la salud y seguridad del trabajador y del medio ambiente. Estas medidas se decidirán a partir de una exhaustiva evaluación de riesgos, cuyas características principales se describen más adelante.

2. TIPOS DE CULTIVO CELULAR

El procedimiento de cultivo celular se define como el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células de organismos pluricelulares *in vitro*, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración se puede hablar de diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantes, primarios o secundarios, etc.

Cultivo organotípico

En el cultivo de órganos (organotípico) la arquitectura característica del tejido *in vivo* se mantiene parcialmente. El órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes, donde libera los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional, generalmente esférica. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, sin embargo, no permite su propagación pues el crecimiento, de producirse, se limita a la periferia. La imposibilidad de propagación obliga, en cada nuevo experimento, a partir de nuevo material animal lo que conlleva una elevada heterogeneidad.

Cultivo de explantes

Los explantes son fragmentos de tejidos u órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia.

Cultivo de células

Este tipo de cultivos suponen una disgregación celular, ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular que se obtiene se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones.

Las células que se cultivan directamente desde un sujeto se conocen como células primarias. La mayor parte de los cultivos celulares primarios tienen un periodo de vida limitado, es decir, después de un cierto número de divisiones las células entran en el proceso de senescencia y dejan de dividirse, generalmente manteniendo la viabilidad.

Ocasionalmente, un cultivo primario se mantiene durante más generaciones de las esperadas. Esto es debido a la aparición en el cultivo de células inmortales, la razón de la inmortalización de estas células es, en la mayor parte de los casos, desconocida, pero se observa que la frecuencia de inmortalización se incrementa me-

dante infecciones virales, tratamientos con mutágenos, etc., por lo que se cree que esta capacidad debe estar relacionada con la pérdida, espontánea o inducida por el tratamiento, de las vías de control celular. Se cree que la capacidad de un cultivo celular primario para establecerse como línea estable está relacionada directamente con su variabilidad genética.

Una línea celular establecida o inmortal es la que ha adquirido la capacidad de proliferar indefinidamente. Hay numerosas líneas celulares bien establecidas representativas de tipos celulares particulares.

El cultivo de las células presenta diversas dificultades en función del tipo de célula en cuestión. Existen grandes diferencias que se relacionan fundamentalmente con el grado de diferenciación del tipo celular. Así pues, en general se puede establecer como norma que una línea celular será tanto más fácil de establecer o cultivar cuanto más indiferenciada sea, con las excepciones de las líneas tumorales de células diferenciadas.

3. TRABAJO EN UN LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR, ACTIVIDADES Y MANIPULACIÓN DEL CULTIVO

En esquema, en un laboratorio de cultivo celular se realizan las siguientes actividades:

- preparación de medios de cultivo,
- esterilización de medios y reactivos,
- lavado, esterilización y preparación del material,
- mantenimiento y uso del aparataje del laboratorio (cabinas de seguridad biológica, incubadores, centrifugas, microscopios, dispositivos de pipeteo, etc.),
- el cultivo celular y la manipulación del mismo.

El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de aparatos que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas para el cultivo (incubadores) y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del exterior (placas Petri, matraces, etc.). Por lo que se considera que el medio de cultivo está formado por cuatro elementos:

- la naturaleza del sustrato o fase en la que crecen las células,
- las condiciones físico-químicas y fisiológicas del medio,
- la naturaleza y composición de la fase gaseosa,
- las condiciones de incubación, especialmente de humedad y temperatura.

En la manipulación de cultivos celulares se realizan generalmente las siguientes tareas:

- disgregación celular para obtener células en suspensión, que puede realizarse por métodos químicos, enzimáticos o mecánicos o por combinación de dos o tres de estos métodos. Como ejemplos, la tripsinización (la tripsina digiere las proteínas responsables de la adhesión celular al sustrato, así las células adheridas al sustrato pasan a estar en suspensión) o el pipeteo repetido o el barrido/arañado de la superficie de cultivo,
- siembra mediante suspensión o depósito de las células en el medio de cultivo,
- congelación (para la conservación de las líneas celulares) y descongelación del cultivo,
- modificación genética de las células, mediante distintos métodos: infección con virus, etc.,
- cambios de medio de cultivo para reponer nutrientes y eliminar productos de desecho que frenen el crecimiento o produzcan la senescencia o la muerte celular,
- diluciones de la densidad celular del cultivo para evitar

la confluencia o inhibición del crecimiento celular por contacto,

- pase de células a otras placas (replaqueo) para la propagación o expansión de la línea celular,
- centrifugación para separar las células del medio de cultivo,
- tinción celular para distinguir entre células vivas y muertas,
- observación al microscopio, para recuento y control morfológico,
- recuento celular.

4. PRINCIPALES RIESGOS BIOLÓGICOS

Los cultivos celulares no contaminados generalmente no presentan un riesgo significativo y la posible inoculación dérmica origina sólo una inflamación local. Sin embargo, estos cultivos pueden contribuir sustancialmente al riesgo de exposición a otros agentes biológicos, ya que pueden actuar como base o ayudar a la supervivencia o a la replicación de agentes oportunistas.

Los agentes contaminantes accidentales, probablemente constituyen el principal riesgo asociado a la manipulación de cultivos celulares, ya que a menudo son difíciles de detectar. Los principales contaminantes son: bacterias, hongos, parásitos, micoplasmas, virus y priones. Esta contaminación puede provenir de la fuente (tejido o células origen del cultivo) o bien producirse en el proceso de manipulación del cultivo, por el empleo de reactivos biológicos contaminados o de material contaminado o por el ambiente de trabajo.

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades CDC, (Centers for Diseases Control and Prevention) indican que los peligros potenciales asociados a los cultivos de células o tejidos humanos incluyen entre otros los patógenos transmitidos por sangre como el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y agentes tales como *Mycobacterium tuberculosis* que puede estar presente en tejidos pulmonares humanos. Estos centros han informado de varios casos de infección en personal de laboratorio que manipulaba cultivos celulares primarios de primates.

Los cultivos de células humanas y de primates pueden contener virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC), virus de las leucemias humanas (VLHT), herpesvirus (Virus de Epstein-Barr, Cytomegalovirus, virus del herpes simplex tipos 1 y 2), retrovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Los cultivos de células animales no procedentes de humanos o de primates pueden contener: Hanta virus, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus de la influenza, etc.

La contaminación por parásitos intracelulares puede resultar un aspecto a tomar en consideración cuando se manejan cultivos celulares primarios en sus primeras etapas procedentes de donantes sobre los que se sabe o sospecha que están infectados. Algunos ejemplos serían: *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp.* etc.

También las células carcinogénicas son fuente de riesgo como resultado de la auto-inoculación accidental del trabajador.

5. EVALUACIÓN DE RIESGOS

La evaluación de riesgos en la manipulación de los cultivos celulares de origen humano o animal se basa tanto en

Fuente (especie de origen) ⁽¹⁾	Tipos de células o tejidos ⁽²⁾	Tipo de cultivo
Orden creciente de riesgo ↓	Orden creciente de riesgo ↓	Orden creciente de riesgo ↓
Células aviares y células de invertebrados	Fibroblastos y células epiteliales	Cultivo de líneas celulares bien caracterizadas
Células de mamíferos (ni humanas ni de primates)	Células de la mucosa intestinal	Cultivo de líneas celulares continuas
Células de primates no humanos	Células endoteliales	Cultivos celulares primarios
Células humanas		
(1) Cuanto mayor sea la relación genética entre las células del cultivo y las humanas, mayor es el riesgo para los humanos, ya que los agentes patógenos suelen tener barreras de especies específicas. ¡ATENCIÓN! <i>Algunos organismos contaminantes podrían cruzar la barrera de las especies habituales (por ejemplo, la gripe H5N1, la EEB, el SRAS, etc.)</i>		
	Tejidos neurales	
	Células hematopoyéticas	
	(2) Tomar en consideración que algunos tipos de células son capaces de inducir tumores	

Tabla 1. Riesgos en función de las propiedades intrínsecas del cultivo

las propiedades intrínsecas del cultivo celular, incluidas las propiedades posteriores adquiridas como consecuencia de una modificación genética, como en la posibilidad de que el cultivo celular pueda estar deliberadamente o inadvertidamente contaminado por agentes patógenos. Esta información permitirá determinar el nivel de riesgo asociado al cultivo celular. La evaluación de riesgos debe tener también en cuenta las condiciones de trabajo.

Propiedades intrínsecas del cultivo celular

Las propiedades intrínsecas de los cultivos celulares que se deben considerar en la evaluación de riesgos son:

- la fuente (especie origen de las células),
- el tipo de células o el tejido de procedencia,
- el tipo de cultivo.

Los cultivos celulares de mayor riesgo son los que proceden de humanos y de primates, especialmente si derivan de sangre periférica, tejido linfoide y nervioso (ver tabla 1).

En ningún caso el trabajador que realice los cultivos celulares podrá utilizar sus propias células para el desarrollo *in vitro*. Las células humanas para cultivo deberán obtenerse solamente de individuos que no tengan relación con el trabajo experimental.

Propiedades adquiridas como resultado de la modificación genética

En el caso de modificaciones genéticas hay que tener en cuenta, que las células recombinantes pueden haber aumentado o disminuido su capacidad de causar daño a la salud humana y el medio ambiente en comparación con sus equivalentes no recombinantes.

La evaluación de riesgos de las células recombinantes se realizará atendiendo a lo establecido en el 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, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente. El primer paso en el proceso de evaluación debe consistir en identificar las propiedades nocivas del organismo receptor (célula huésped) y, en su caso, del donante, así como cualquier propiedad nociva relacionada con el vector o con el material introducido, incluidas las alteraciones de las propiedades iniciales del receptor.

Propiedades adquiridas como resultado de una infección con agentes patógenos

En el caso de cultivos celulares deliberadamente o inadvertidamente contaminados por agentes patógenos, la evaluación de los riesgos potenciales del cultivo celular contaminado o infectado por el patógeno requiere un examen de las propiedades intrínsecas del patógeno. El riesgo biológico del cultivo celular infectado dependerá del riesgo biológico del patógeno, según la clasificación en grupos de riesgos de los agentes biológicos establecida en el Artículo 3 del Real Decreto 664/1997.

Condiciones de trabajo

Finalmente, en la evaluación de riesgos hay que tener en cuenta la posibilidad de dispersión del material infeccioso y de exposición del trabajador en función de las características del trabajo como:

- procedimientos y técnicas utilizados,
 - equipos y material que se va a utilizar,
 - cantidad o concentración del agente infeccioso, etc.
- Con toda la información recogida se determinará el nivel de bioseguridad necesario para el trabajo en laboratorio con cultivos celulares.

6. NORMAS DE TRABAJO EN LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES

Las normas a seguir en el trabajo con cultivos celulares para proteger al trabajador, al medio ambiente y al cultivo son:

- proporcionar formación y capacitación al operador o al trabajador en relación a las buenas prácticas microbiológicas, los riesgos y las medidas de prevención,
- adoptar el principio de precaución, tratar todos los cultivos que se utilizan por primera vez como potencialmente infecciosos. Trabajar siempre dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II (protege a la muestra, al trabajador y al ambiente), hasta que se demuestre que los cultivos están libres de bacterias, virus, micoplasmas u hongos,
- manipular los cultivos celulares de origen humano o de primates, en general, en un nivel de bioseguridad 2 y en una cabina de seguridad biológica tipo II,

- manipular los cultivos celulares procedentes de fuentes infectadas mínimo en un nivel de bioseguridad 2, adoptar niveles superiores en función del riesgo del agente patógeno,
- identificar de forma adecuada los cultivos y todo el material biológico,
- obtener siempre los cultivos de centros reconocidos que certifiquen el origen, por ejemplo: la Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC, (*American Type Culture Collection*), la Colección Europea de Cultivos Celulares ECACC, (*European Collection of Cell Cultures*) o de la Colección Española de Cultivos Tipo CECT, etc.,
- rechazar cultivos no seguros, poco caracterizados o sin referencia o tratarlos con la precaución adecuada,
- trabajar siempre con material estéril (pipetas, matraces, etc.). El material estéril sólo puede abrirse, dentro de una cabina de seguridad biológica. Todo aquello de lo que no se esté seguro al 100% de su esterilidad ha de ser considerado como no estéril,
- descontaminar la mesa de trabajo, las cabinas de seguridad biológica y el material reutilizable antes y después de trabajar con material biológico,
- limpiar inmediatamente cualquier derrame del cultivo,
- lavarse las manos antes, después y frecuentemente durante el trabajo con cultivos, para evitar contaminaciones en los experimentos, la contaminación del usuario con material biológico y la posible diseminación de éste,
- descontaminar por agentes químicos o calor todo el material biológico o contaminado con éste antes de ser eliminado,
- si se trabaja con más de una línea celular a la vez, evitar la contaminación cruzada. Limpiar y desinfectar las superficies y útiles de trabajo cada vez que se trabaja con distintas líneas. Manipular en último lugar la línea de mayor proliferación,
- en caso de cultivos de larga duración, verificar periódicamente las propiedades del cultivo. Llevar a cabo un control de calidad de las células, que demuestre la ausencia de posibles agentes patógenos,
- establecer un programa adecuado de almacenamiento de línea celular,

- utilizar equipos de protección individual: guantes, mascarillas, gafas, ropa de protección,
- implantar programas específicos de vigilancia de la salud del trabajador, siendo recomendable la vacunación contra la hepatitis B, por el riesgo de exposición a patógenos transmitidos por sangre.

En resumen, la manipulación de cultivos celulares requiere de instalaciones, equipos y prácticas microbiológicas adecuadas para evitar la contaminación del cultivo, la dispersión de posibles agentes patógenos y para eliminar o reducir al mínimo la exposición del trabajador.

La característica principal que define a un laboratorio de cultivo celular es que ha de ser una instalación aséptica (sala de cultivo limpia, con cabinas de seguridad biológica de tipo II, incubadores y materiales estériles), debido a que la tasa de crecimiento de las células en cultivo es muy inferior a la de sus contaminantes habituales: hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas. Por ello, para el mantenimiento del cultivo es vital evitar la aparición en éste de cualquier microorganismo contaminante.

El área de trabajo para realizar cultivos celulares debe ser una parte o habitación del laboratorio aislada, alejada de las vías de paso y, si es posible, dedicada exclusivamente al cultivo de células. La utilización de cabinas de seguridad biológica reduce las necesidades de aislamiento, pero aún así, es recomendable mantener un gradiente de esterilidad, desde el medio exterior o laboratorio general al interior de las cabinas de seguridad donde se manipularán los cultivos y al incubador donde se mantendrán.

El nivel de bioseguridad necesario para el trabajo en laboratorio con cultivos celulares se decidirá en función de una exhaustiva evaluación de riesgos, en la que se tendrá en cuenta el nivel de riesgo asociado al cultivo y las condiciones de trabajo. Normalmente, el nivel de bioseguridad 2 es el mínimo necesario para el trabajo con cultivos celulares, con el empleo de una cabina de seguridad biológica tipo II. Se deberán utilizar niveles de bioseguridad superiores en el caso de modificaciones genéticas o cuando el cultivo este deliberadamente contaminado con agentes patógenos o sea sospechoso de estarlo.

BIBLIOGRAFÍA

- PAUWELS, K. ET AL.
Animal cell cultures: risk assessment and biosafety recommendations
Appl Biosafety, 2007, 12, (1), 26- 38
- RAMOS GÓMEZ, M. Y MARTÍNEZ SERRANO, A.
Curso de cultivos
Universidad Autónoma de Madrid. Junio 2008.
http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/ldesviat/_private/BIOQ%2520EXPIII/CursocultivosUAM2008.pdf
- REINA, M. Y AULADELL, C.
Técnicas de estudio de líneas celulares
Universidad de Barcelona 2003
http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/tecnicas_de_cultivo_celular.htm
- Real Decreto 664/1997 de 12 de mayo. Sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO
Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos.
INSHT 2003

- (6) Ley 9/2003, de 25 de abril, **por la que se establece el Régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente, a fin de prevenir los riesgos para la salud humana y para el medio ambiente** y R.D 178/2004, de 30 de enero, para el Desarrollo y Ejecución de esta Ley.
- (7) U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (fifth edition)
U. S. Government Printing Office. Washington. 2007
- (8) HEALTH CANADA
Laboratory Safety Guidelines
Health Canada, 3ª ed, 2004.
- (9) ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD
Manual de bioseguridad en el laboratorio (3ª edición)
OMS. Ginebra. 2005
- (10) INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO
Nota técnica de prevención nº 376 “Exposición a agentes biológicos: seguridad y buenas prácticas de laboratorio
INSHT.

