

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.
Departamento de Bioquímica Clínica.
Área Tecnología en Salud Pública.
Asignatura Electiva Salud Pública.
Año: 2004.
Autor: Lic. Florencia Mangiameli.

Consideraciones sobre Bioseguridad en Biología Molecular

La Biología Molecular es un área en rápido crecimiento, con amplias implicancias en las Ciencias Biomédicas. Dado que esta disciplina está fuertemente asociada al estudio de los ácidos nucleicos, no puede sorprendernos que muchos de los agentes usados en sus experimentos sean potencialmente mutagénicos. Entre ellos encontramos: tinturas y agentes intercalantes, agentes alquilantes mutágenos y carcinógenos, radiación ionizante y UV, solventes de extracción y purificación, antibióticos, fagos y oncovirus. Por esto, al trabajar en Biología Molecular, cualquiera sea el ámbito, es importante implementar y respetar las Normas de Prevención y Seguridad Biológicas, usando los equipos adecuados.

Si bien la exposición a agentes microbiológicos potencialmente peligrosos puede darse en cualquier momento y en cualquier etapa del proceso, las situaciones más típicas ocurren durante pasos de procesamiento intermedio con células viables o purificación. Para el caso de los elementos celulares y productos de ADNr, esta puede ocurrir durante el cultivo del agente huésped a pequeña y gran escala, así como durante los pasos de purificación, formulación y llenado. La posibilidad de exposición se incrementa al aumentar la escala del proceso, y al concentrarse los productos. Las causas pueden ser muy variadas, como fallas en el diseño de trabajo, procedimientos inadecuados y pérdidas, y por supuesto, incumplimiento de las normas de prevención y seguridad. En todos los casos, la principal ruta de exposición es la inhalación o absorción cutánea de aerosoles.

NO subestimar el riesgo de exposición a agentes patogénicos.

Pero cuando hablamos de trabajar en un laboratorio de Biología Molecular, o que utiliza estas técnicas, nos interesa saber en primer lugar, cuál es el objetivo del mismo: realizar un diagnóstico por técnicas de biología molecular o trabajar con ADN recombinante (ADNr); ya que, si bien las precauciones que se tomen serán básicamente las mismas, existen algunas diferencias adicionales particulares para cada una.

1) Entre las precauciones y hábitos de trabajo que comparten ambos campos, investigación y diagnóstico, y que no están comprendidas o especificadas en las Normas Universales de Prevención, encontramos:

- ✓ Restricción del acceso a las áreas de trabajo. El director del proyecto de investigación, y/o del laboratorio será quién otorgue el permiso a quienes trabajen en el lugar.
- ✓ Aunque se requieren condiciones de un NBS2 para amplificar ADN, usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es importante que esta operación y el laboratorio donde se realice, estén aislados de los otros laboratorios o áreas de trabajo, para evitar la contaminación de las muestras y de los ambientes de trabajo. Además, tendrán espacios físicos separados, para evitar la contaminación interna con productos de PCR, a saber:

↳ pre PCR, para separación y preparación de muestras antes del ciclado

- ↪ post PCR, donde se realiza la detección de las mismas
- ↪ análisis de resultados, generalmente fuera del laboratorio

- ✓ Las distintas salas se comunican por puertas vaivén, que **deben** permanecer cerradas mientras se trabaja, así como la puerta de ingreso general. La circulación en el laboratorio es unidireccional.
- ✓ En caso de no contar con salas separadas, los ensayos con menor potencial de riesgo biológico podrán realizarse al mismo tiempo en lugares cuidadosamente delimitados del mismo laboratorio.
- ✓ Cada sala tendrá su propio material (pipetas, papel absorbente, tubos, soluciones, reserva de agua destilada, etc.) el cual no es intercambiable, bajo ningún concepto. **El material que se usa para PCR NO se usa para ninguna otra tarea.**
- ✓ El personal tendrá a su disposición, los elementos de protección personal (batas, gafas, guantes, gorros, etc.), que el responsable del laboratorio considere necesarios. Estos elementos **serán de uso exclusivo del laboratorio, y no podrán ser retirados del mismo.** Serán descontaminados antes de su limpieza.
- ✓ La preparación o mezcla de soluciones stock de agentes mutagénicos y/o cancerígenos volátiles, como el bromuro de etidio debe hacerse con una máscara o protección similar contra vapores, si las soluciones están concentradas.
- ✓ Se usarán guantes para la preparación y manipulación de cualquier solución nociva o potencialmente peligrosa. También se recomienda el uso de doble guante cuando se manipulan geles que fueran tratados con agentes intercalantes o soluciones de las mismas, por su capacidad de penetración cutánea. Un correcto lavado de manos debe realizarse luego de manipular estas sustancias, y luego de quitarse los guantes.
- ✓ Si las ventanas del laboratorio se abren, deberán tener tela metálica, para evitar la entrada de insectos.
- ✓ Se dispondrá de un autoclave para descontaminar los residuos del laboratorio cuando esto sea necesario.
- ✓ Se usan CSB u otro equipo de contención física o protección personal, siempre que

↪ se realicen operaciones con gran potencial de producir aerosoles, como centrifugación, pulverización, mezcla con licuadoras o agitación vigorosa, desintegración sónica, apertura de envases de materiales cuya presión interna pueda ser diferente que la ambiental, inoculación trans nasal de animales y recolección de tejidos infectados de animales y nuevos;

↪ se usen altas concentraciones o grandes volúmenes de organismos que contienen, moléculas de ADNr.

- ✓ Los cultivos de microorganismos o de células (incluso aquellos que contengan moléculas de ADNr) se manipularán en un sistema cerrado (ej. Recipiente para propagación proliferación y almacenamiento, para traslado o ventilación) u otro equipo de contención primaria (como gabinetes de seguridad biológica equipados con centrífuga para manipular los líquidos de cultivo). Todos estos sistemas se inspeccionarán periódicamente, para determinar que no haya fallas de contención.

Por ejemplo, si comparamos el diagnóstico de rutina de HIV con los trabajos de investigación con HIV (incluyendo co - cultivos, estudios de replicación viral, o manipulación de virus concentrados), el primero puede hacerse en forma segura con una contención física de NBS2, usando las prácticas y procedimientos del mismo, mientras que el segundo puede ser realizado en un NBS 2, usando las prácticas y procedimientos de un NBS3.

2) Si hablamos de un Laboratorio Clínico, donde lo que se busca es hacer un diagnóstico utilizando técnicas de Biología Molecular, como PCR o determinación de la Carga Viral, además de las precauciones específicas relacionadas al agente patógeno en cuestión, se tendrán en cuenta aquellas específicas de cada técnica.

- ↪ Incorporación de controles: positivos, negativos, internos.
- ↪ Correcta obtención, traslado, separación y conservación de las muestras.
- ↪ Área de conservación de muestras, sueros, etc.

3) En el caso de trabajar con Tecnología Recombinante, el grado de seguridad dependerá del material con que se trabaje, su virulencia, patogenicidad, posibilidad de contagio y la posibilidad de "escape del producto" hacia el medio ambiente, antes de probar su inocuidad. No debemos olvidar, que si construimos un organismo nuevo por ingeniería genética, éste no estará caracterizado, y debemos considerar que pueda ser más dañino que la/s especie/s original/es, hasta demostrar lo contrario.

El NHI define las moléculas de ADNr como: (1) moléculas que son construidas fuera de células vivas por unión de moléculas de ADN naturales o sintéticas, que pueden replicar en una célula viva, o (2) moléculas de ADN que resultan de la replicación de aquellas definidas en (1). Los segmentos de ADN sintético que pudieran producir un oligonucleótido o polipéptido potencialmente nocivo (ej. una toxina o un agente farmacológicamente activo) se consideran equivalentes al ADN natural correspondiente. Los segmentos de ADN sintético que no se expresan in vivo como producto biológicamente activo de oligonucleótidos o polipéptidos está exento de estas consideraciones.

Básicamente, los niveles de Bioseguridad que se implementen serán iguales a los de cualquier laboratorio microbiológico, excepto en aquellos casos en que, luego de un análisis del proyecto por personal calificado, se indique lo contrario. En estos casos, se determinará si se puede aumentar o disminuir el nivel de seguridad a utilizar; y para ello se tendrán en cuenta:

- ↪ Propiedades del organismo dador de genoma
- ↪ Propiedades del organismo receptor de genoma
- ↪ Secuencia a insertar
- ↪ Sitio de inserción
- ↪ Propiedades del ambiente en que se desarrollará el OGM
- ↪ Sistema de expresión génica y sistemas de contención utilizados: Los sistemas de expresión biológica (vectores y células huésped) que se pueden usar deben cumplir ciertas condiciones, como inocuidad, incapacidad de autotransferencia a organismos salvajes, conocimiento de su genoma completo (de ser posible). Ejemplos: plásmido pUC18 y sus derivados, en combinación con E. coli K12.

Los métodos más rutinarios de Ingeniería Genética que usan sistemas de este tipo, pueden realizarse en niveles de contención física, equivalentes a NBS2, siempre que el inserto de genoma no requiera un nivel de seguridad superior. Cuando se trabaje con secuencias de ADN de conocido peligrosidad biológica (ej. : cepas patogénicas de virus y bacterias) o que aún no han sido caracterizadas completamente, se debe utilizar el mismo nivel de bioseguridad que para el organismo fuente.

Según las posibles combinaciones de agentes, huéspedes y vectores, podemos encontrar las siguientes categorías de trabajo:

- √ Experimentos en los cuales se emplean agentes patógenos humanos o animales (clase 2, 3, 4 o 5) como sistemas de huésped – vector:

- ↪ Los experimentos en los que se introduce ADNr en agentes de clase 2, pueden llevarse a cabo en condiciones de contención de NBS2,
- ↪ Los experimentos en los que se introduce ADNr en agentes de clase 3, pueden usarse NBS3,
- ↪ Los experimentos en los que se introduce ADNr en agentes de clase 4, pueden usarse NBS4,
- ↪ Para los casos en que se introduce ADNr en agentes de clase 5, las condiciones de contención se establecerán para cada caso en particular y de acuerdo al reglamento específico de cada país respecto al manejo de agentes patógenos extraños a su territorio.

√ Experimentos en los cuales el ADN de agentes patógenos humanos o animales (clase 2, 3 4 o 5) se clona en sistemas de huésped – vector procarióticos o eucarióticos inferiores no patógenos:

- ↪ Los experimentos con ADNr en los que el ADN de agentes de clase 2 o 3 se transfiere a organismos procarióticos o eucarióticos inferiores no patógenos pueden llevarse a cabo en condiciones de contención de NBS2.
- ↪ Si proviene de agentes de clase 4, puede usarse un NBS2 después de demostrar que solo una fracción total o irreversiblemente defectuosa del genoma del agente se halla presente en un recombinante dado. A falta de esa demostración, las condiciones de contención serán de NBS4.

√ Experimentos en los que se emplean virus infecciosos de ADN o ARN animal o vegetal o virus defectuosos de ADN o ARN animal o vegetal en presencia de virus auxiliares en sistemas de cultivo de tejidos:

- ↪ Para los de clase 2, pueden usarse NBS2.
- ↪ Para los de clase 3, pueden usarse NBS3.
- ↪ Para los de clase 4, pueden usarse NBS4.
- ↪ Para los de clase 5 se determinará en cada caso de acuerdo a las normas que establezcan las autoridades correspondientes.

√ Experimentos con ADNr en los que se emplean plantas o animales enteros:

El ADNr o las moléculas de ARN de allí derivadas procedentes de cualquier fuente, excepto de una fracción mayor a dos tercios de un genoma vírico eucariótico, pueden transferirse a cualquier organismo vertebrado no humano y propagarse en condiciones de contención física comparables al NBS2 y apropiadas al organismo objeto de estudio. Es importante que se demuestre que el fragmento del genoma vírico empleado no conduce a una infección productiva.

4) Seguridad Biológica en Industrias Biotecnológicas

Además de los requerimientos generales como zonas de presión diferencial, sistemas de filtración de aire y contención, y sistemas de tratamientos de desechos, y de cumplir con todas las recomendaciones incluidas en el punto (3), cada proceso de manufactura debe estar completamente estandarizado, según las Buenas Prácticas de Manufactura, procedimientos operacionales estándares, agendas de mantenimiento preventivo, y procedimientos de control de calidad validados.

Las aplicaciones industriales de producción de ADNr implican la propagación de organismos huéspedes o cultivos celulares a gran escala, siendo esta última mayor a 10 litros, según el NHI. Para esta se definieron en 1981, tres niveles de bioseguridad: Niveles 1, 2 y 3 de Bioseguridad a Gran Escala (BSL-1LS, BSL-2LS y BSL-3LS según las siglas en inglés), y la mayoría de las operaciones de manufactura biotecnológica usan el BSL-1LS. Se ha recomendado que los

organismos sean manipulados en un nivel de Bioseguridad equivalente al usado en un laboratorio común. Actualmente, se reconoce un cuarto nivel de Bioseguridad a Gran Escala, el GLSP (del inglés, Buenas Prácticas a Gran Escala), y los criterios que utiliza para determinar las medidas de prevención a utilizar, son:

1. Huéspedes no patogénicos, bien caracterizados
2. Huéspedes con un extenso historial de uso seguro
3. Huéspedes sin agentes extraños
4. Huéspedes que contienen insertos bien caracterizados
5. Insertos que están libres de secuencias peligrosas
6. Vectores limitados en su tamaño
7. Vectores pobremente movilizables
8. Insertos en huéspedes vectores que son incapaces de transferir ADN a huéspedes salvajes

Una vez evaluado el potencial de peligrosidad del agente en base a la clasificación anterior, se determinarán las condiciones de contención física y las medidas de prevención a utilizar.

Bibliografía consultada:

- ✓ DNA Fingerprinting. An introduction - Lorne T. Kirby - W. H. Freeman and Company. New York
- ✓ Guías para el uso y la seguridad de las técnicas de ingeniería genética o tecnología del ADN recombinante. OPS/OMS - OEA - OIE - IICA
- ✓ GUIDELINES FOR RESEARCH INVOLVING RECOMBINANT DNA MOLECULES (NIH GUIDELINES) April 1998