

LAS CÉLULAS HELA Y SU APORTACIÓN AL PROGRESO DE LA CIENCIA

PAULA GONZÁLEZ GONZÁLEZ-BOZA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA





Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia
Trabajo Fin de Grado
Revisión bibliográfica

Las células HeLa y su aportación al progreso de la ciencia

Paula González González-Boza
Tutora: Consolación Martínez García
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Sevilla, Julio 2022

RESUMEN

Las células HeLa constituyen una línea celular que deriva de la biopsia realizada al adenocarcinoma cervical de una mujer afroamericana llamada Henrietta Lacks en 1951 en Estados Unidos. Al cultivarlas, los científicos se percataron de su naturaleza tan singular, que les permitía crecer a un ritmo nunca visto antes en células similares. Además, tenían la característica de que siempre y cuando se les nutriera adecuadamente, podían seguir reproduciéndose indefinidamente.

El descubrimiento de estas células puede ser considerado como uno de los que más ha contribuido al desarrollo y al avance de la ciencia en los últimos años. Gracias a ellas se han podido desarrollar vacunas como la de la poliomielitis o la del virus del papiloma humano, se han estudiado los mecanismos de acción de algunos virus y se han producido grandes avances en la terapia contra el cáncer.

Sin embargo, a lo largo de sus casi setenta años de existencia HeLa también ha suscitado polémicas, ya que las células se obtuvieron sin que la paciente accediera a ello, y consecuentemente contribuyeron al entendimiento y la instauración de leyes acerca del consentimiento y los derechos de los sujetos en investigaciones humanas.

Actualmente, esta línea celular está presente en muchos laboratorios y se utiliza frecuentemente. Las células HeLa continúan favoreciendo el avance científico e incluso han jugado un papel fundamental al inicio de la pandemia de COVID-19.

En esta revisión bibliográfica se pretende conocer qué avances de la ciencia se han realizado gracias a estas células y analizar su impacto en la comunidad científica.

Palabras clave: células HeLa, cultivo celular, Henrietta Lacks, investigación cáncer.

ÍNDICE

1. Introducción.....	7
2. Objetivos.....	12
3. Metodología.....	12
4. Resultados y discusión.....	14
4.1. Contexto histórico	14
4.2. Las células HeLa en la investigación científica	16
4.2.1. Desarrollo de la vacuna de la poliomielitis	17
4.2.2. Radioterapia	22
4.2.3. Desarrollo de medicamentos anticancerosos.....	24
4.2.3.1. Hidroxiurea	25
4.2.3.2. Camptotecina	25
4.2.3.3. Talidomida	26
4.2.4. Desarrollo de la vacuna del VPH	27
4.2.5. Otras aportaciones	28
5. Conclusiones	30
6. Bibliografía	31

1. Introducción

Para entender la importancia de las células HeLa y su valor para la comunidad científica, se debe comprender primero qué es un cultivo celular y su historia y evolución.

La idea de cultivar células aisladas del organismo se remonta a finales del siglo XIX como una manera de estudiar el comportamiento de células animales, libres de las variaciones sistemáticas que pudieran aparecer *in vivo* durante un equilibrio homeostático normal.

A principios de la década de 1880, el farmacólogo y fisiólogo Sydney Ringer publicó cuatro artículos en *The Journal of Physiology* en los que relataba la importancia de las iones de calcio, sodio y potasio a la hora de prevenir o revertir la acidificación asociada con la contracción cardíaca. Lo que descubrió fue una solución salina capaz de mantener el latido del corazón con una frecuencia normal durante varias horas. Esta solución se considera como la precursora de todas las posteriores soluciones salinas fisiológicas que permiten mantener la función celular normal *in vitro* (Miller, 2004).

Tras el éxito de la solución de Ringer, hubo varios intentos de encontrar un método que consiguiera prolongar el tiempo de vida de estas células e inducir su proliferación (Delgadillo, 2021). Destaca el trabajo de Wilhelm Roux, que en 1885 mantuvo una porción de la médula de un embrión de pollo en una solución salina tibia durante varios días, demostrando así que las células podían sobrevivir fuera del organismo (Hoffman, 2016). Otros como Leo Loeb en 1897 o Justin Jolly en 1903 también lo intentaron, pero no consiguieron que las células se dividieran ni que aparecieran figuras mitóticas en el cultivo (Yao y Asayama, 2017).

El primer gran avance no se consiguió hasta 1907, cuando Ross G. Harrison (fig. 1) decidió estudiar una fibra nerviosa en crecimiento para observar lo que ocurría durante el desarrollo embrionario. Para ello, tomó embriones de rana y aisló las

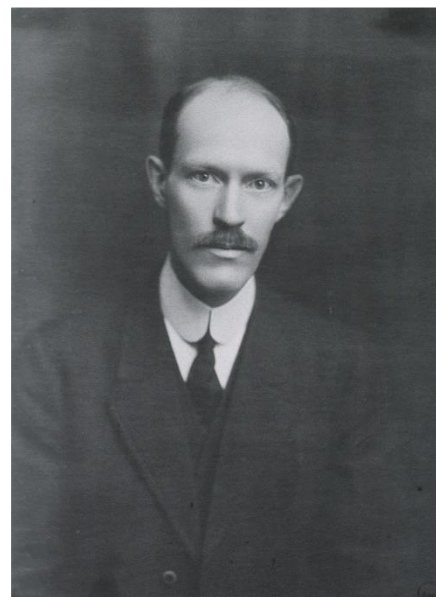


Figura 1. Ross Granville Harrison (Bennett, 1911)

partes de su tejido conocidas por dar lugar a fibras nerviosas. A esta muestra le añadió una gota de linfa obtenida del saco linfático de una rana adulta que, gracias a su rápida coagulación mantenía el trozo de tejido en una posición fija (Harrison, 1906). Harrison consiguió mantener algunas muestras vivas hasta cuatro semanas, además observó cómo las fibras nerviosas continuaban desarrollándose como si siguieran formando parte del embrión. Aunque no encontró evidencia de que ocurriera un crecimiento celular como tal definido por la multiplicación de células, este experimento está considerado por muchos como el comienzo del cultivo celular. Sin embargo, algunos miembros de la comunidad científica argumentaron en su época que esto no se podía considerar como un verdadero cultivo, ya que no hubo proliferación celular. Aun así, no cabe duda de que, con su trabajo, Harrison estableció una metodología que más tarde llegaría a convertirse en la base para crear cultivos celulares (Ambrose, 2019).

En un artículo publicado en *The Journal of Experimental Medicine* en 1911 por Alexis Carrel y Montrose Thomas Burrows, se define por primera vez un cultivo como “un medio plasmático inoculado con pequeños fragmentos de tejido vivo [...] caracterizado por un crecimiento activo de las células del fragmento original en dicho medio plasmático”. En este artículo, Carrel y Burrows reconocen en los experimentos de Harrison el primer momento en el que se consiguió un cultivo tisular aislado del organismo. Adaptaron y mejoraron el método de Harrison para poder utilizar células de animales de sangre caliente y consiguieron cultivar tejido adulto de mamíferos *in vitro*. Pudieron observar directamente la división de un núcleo y numerosas figuras cariocinéticas (Carrel y Burrows, 1911).

Posteriormente, Carrel intentó determinar las condiciones en las que la vida de un tejido aislado del organismo pudiera ser prolongada indefinidamente. Según su teoría, la senilidad y muerte de un cultivo ocurrían por causas prevenibles tales como la acumulación de sustancias catabólicas o el agotamiento del medio de cultivo, y que evitando dichas situaciones, un cultivo envejecido podría regenerarse y prevenir su muerte. El primer experimento que llevó a cabo en septiembre de 1911 fue intentar aumentar la duración de la vida tisular con repetidos lavados con la solución de Ringer y cambiando el medio de cultivo cada poco tiempo. Lo que observó fue que algunos cultivos podían aguantar hasta 60 días, y con esto concluyó que la muerte temprana de

las células era prevenible y que la vida celular permanente no era imposible (Carrel, 1912). Carrel mantuvo vivo uno de estos cultivos de tejido embrionario aislado de corazón de pollo durante 32 años, convirtiéndose en una célebre línea celular.

En años posteriores, otros investigadores como Raymond Pearl intentaron, sin éxito, replicar este crecimiento indefinido, fracaso que fue achacado a una técnica inadecuada. Sin embargo, en 1961, Leonard Hayflick y Paul Moorhead demostrarían que las células embrionarias humanas cultivadas *in vitro* tienen una vida limitada (Hayflick y Moorhead, 1961). Estudios similares realizados con células embrionarias de pollo indicaron que estas células sólo pueden dividirse hasta 41 veces, o lo que es lo mismo, durante 50 o 60 días (Hay y Strehler, 1967). Desde entonces, ha habido numerosos intentos de explicar la manera exacta mediante la cual Carrel consiguió esta supuesta línea inmortal. Una de las explicaciones posibles es que, sin saberlo, se añadieran nuevas células cada vez que se cambiaba el medio de cultivo, ya que se usaba un “jugo embrionario” que, de no ser preparado correctamente, podría haber contenido células vivas (Witkowski, 1980).

En 1916, los científicos Peyton Rous y Frederic S. Jones descubrieron que para que las células de un cultivo pudieran mantenerse vivas y seguir creciendo durante largos periodos de tiempo, era necesario trasplantarlas de un envase de cultivo a otro. Esto se denominó “pasaje o subcultivo”, y Rous y Jones utilizaron tripsina para digerir las proteínas que hacían que las células se quedaran pegadas al recipiente donde estaban siendo cultivadas (Rous y Jones, 1916).

En 1925, Albert Fischer publicó *Tissue culture: Studies in Experimental Morphology and General Physiology of Tissue Cells In Vitro*, un libro en el que definía, entre otras cosas, los requerimientos que debía tener un medio de cultivo para que se diera el crecimiento celular. Su conclusión fue que la mayoría de las células podían proliferar en una formulación relativamente simple de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y glucosa, que además debían ser suplementadas con suero (Fischer, 1925).

Hasta mediados de siglo, se desarrollaron distintos métodos de obtención de cultivos y de mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. El siguiente gran progreso no se daría hasta 1948, cuando Cruickshank y Lowbury utilizaron cultivos

celulares para probar la toxicidad de diferentes antibióticos sobre la piel y determinar cuál era menos peligroso para su aplicación tópica (Cruickshank y Lowbury, 1952).

Durante los comienzos del cultivo celular, estos se desarrollaban a partir de una población de diferentes células de un mismo tejido. A medida que mejoraron los métodos de cultivo, surgió la necesidad de seleccionar un solo tipo específico de célula y multiplicarla para poder estudiarla mejor (Freshney, 2016). Entre 1920 y 1930 hubo algunos esfuerzos fallidos, y no fue hasta 1948, cuando un grupo de investigadores del *National Cancer Institute* compuesto por Katherine Sanford, Wilton Earle y Gwendolyn Likely, pudieron establecer la primera población de células de ratón clonadas. Para su experimento, usaron la línea celular L desarrollada por el propio Earle anteriormente (Earle et al., 1943).

Como ya adelantaba Fischer en su obra, las células cambian la constitución bioquímica del medio en el que viven, por lo que Sanford, Earle, y Likely se plantearon que quizás la inhabilidad de aislar células únicas se debía a que una sola célula no era capaz de modificar el gran volumen de medio de cultivo en el que se encontraba. En el artículo, expusieron cómo disminuyendo este volumen de medio de cultivo y ajustando la composición de dicho medio, lograron cultivar una línea celular totalmente aislada de otras células y obtenerla en un tamaño comparable al de otros cultivos multicelulares (Sanford et al., 1948). Esta línea celular se denominó L-929 y su uso se generalizó por todo el mundo, convirtiéndose en una de las líneas celulares animales más utilizadas de los últimos 50 años.



Figura 2. George Gey y Margaret Gey en el parque del hospital Johns Hopkins (Ambrose, 2015)

En 1952, George Gey y su esposa Margaret (fig. 2), investigadores en el departamento de cultivo tisular de la *Johns Hopkins University* llevaban años intentando aislar células carcinógenas humanas con la expectativa de poder entender mejor la enfermedad del cáncer. Gey intentaba cultivar cualquier

tipo de células que encontraba, pero siempre sin éxito. La mayoría no sobrevivían, y las que lo hacían no duraban mucho tiempo o crecían muy poco. Su asistente, Mary Kubicek, era la encargada de cultivar las células. Un día llegó a sus manos la muestra del tumor cervical de una paciente llamada Henrietta Lacks. Kubicek no le dio demasiada importancia, ya que recibía muchas muestras de este estilo, hasta que se dio cuenta de que estas células no sólo no morían, sino que se reproducían a una velocidad como nunca había visto antes. Tras este descubrimiento, Gey apareció en televisión explicando que estas células ayudarían a entender cómo acabar con el cáncer (Skloot, 2010).

A esta nueva línea celular se le llamó células HeLa. Estas células continúan dividiéndose actualmente y, aunque nunca se cumplieron las esperanzas de Gey, su contribución al desarrollo de la ciencia, como veremos, ha sido inmensurable.

2. Objetivos

El principal objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es realizar una revisión bibliográfica y recopilar información sobre las células HeLa y su papel en el desarrollo y avance de la ciencia.

A través de la consulta en diferentes bases de datos, se pretende explorar las ramas de la investigación científica en las que el uso de estas células ha sido más productivo, estudiar en relativa profundidad algunos de estos avances, analizar la relevancia actual de estas células y determinar si se sigue recurriendo a ellas para la investigación o si por el contrario han surgido nuevas líneas celulares que las hayan sustituido.

Como objetivo secundario, se pretende dar a conocer la historia de Henrietta Lacks, y a su vez, explorar el contexto histórico en el que nació esta línea celular, las circunstancias de su origen y la influencia que estas han tenido en el campo de la bioética.

3. Metodología

Para la elaboración de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de artículos académicos utilizando como principal fuente de información las bases de datos PubMed y Web of Science. En alguna ocasión puntual también se ha utilizado Google Académico y el catálogo FAMA gracias al acceso que permite la Universidad de Sevilla.

Antes de empezar a redactar, se realizó la lectura del libro *The Immortal Life of Henrietta Lacks* de Rebecca Skloot en el que se narra el nacimiento de las células HeLa y la vida de la familia Lacks para poder situar el trabajo en el contexto histórico que requiere.

La primera búsqueda bibliográfica se realizó en español y en inglés. Se determinó que la mayoría de los artículos originales necesarios para la realización del trabajo se encontraban en inglés, por lo que en las búsquedas sucesivas se usó solamente este idioma.

Para tener una idea general sobre los diferentes acontecimientos en los que influyeron las células HeLa, se ha utilizado la línea temporal de investigaciones relacionadas con HeLa publicada por *National Institutes of Health* en 2018 (NIH, 2018).

En cuanto a la búsqueda de artículos en las bases de datos utilizadas, se utilizaron en un principio las palabras clave “HeLa cells”. Al buscar, se consiguieron 118.259 resultados en PubMed y 167.450 en Web of Science. Para conseguir un número de artículos más manejable se añadió una o varias palabras relacionadas con el tema sobre el que se estuviera indagando en ese momento. Por ejemplo: HeLa cells AND poliomyelitis vaccine, HeLa cells AND HPV, HeLa cells AND cancer research. En algunos casos se refinó aún más la búsqueda con la palabra “history” para encontrar revisiones bibliográficas que ayudaran a entender el proceso de cada acontecimiento. Por ejemplo: HeLa cells AND poliomyelitis vaccine AND history.

A la hora de delimitar la búsqueda de resultados, no se acotó por años, ya que al tratarse de un trabajo del área de Historia de la Farmacia, era más que posible que se encontraran resultados convenientes de hasta principios del siglo XX o incluso anteriores.

Para la lectura de artículos y libros antiguos se ha recurrido a la página web archive.org. El archivo más antiguo utilizado en este trabajo es un libro sobre los inicios de la poliomielitis de 1789.

Por último, para la correcta redacción de este documento se ha utilizado de manera puntual un traductor inglés-español (Linguee) y un diccionario de sinónimos en español (WordReference).

4. Resultados y discusión

4.1. Contexto histórico

Henrietta Lacks (fig. 3), la madre de las células HeLa, y en cuyo honor se llaman así, fue una mujer afroamericana que nació bajo el nombre de Loretta Pleasant (el cual más tarde cambiaría por Henrietta) el 1 de agosto de 1920 en Roanoke, Virginia.

En 1950, Henrietta estaba preocupada porque se notaba un nudo en el vientre, pero no se lo había dicho a ningún profesional porque, entre otras cosas, se quedó embarazada de su quinto hijo (Skloot, 2010). No sería hasta un año después cuando acudiría al pabellón para personas negras del Hospital Johns Hopkins porque presentaba un sangrado vaginal sin explicación. El ginecólogo que la examinó, Howard W. Jones, descubrió una pequeña lesión de unos 25 milímetros en su cuello uterino. Jones escribió en sus notas, publicadas más tarde en el *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, que dicha lesión tenía relieve, era suave, brillante, morada y tan sensible que sangraba con el mínimo roce, por lo que realizó una biopsia del tumor y la mandó a analizar. Los resultados lo identificaron inicialmente como un carcinoma epidermoide cervicouterino (Jones, 1997), pero años más tarde, en 1971, el propio Jones junto con otro ginecólogo, volvería a examinar la biopsia y descubriría que Henrietta había recibido un diagnóstico erróneo y que realmente se trataba de un “adenocarcinoma cervical muy agresivo” (Jones et al., 1971).

El 5 de febrero de 1951, Henrietta recibió el primer tratamiento con radioterapia. Lo que ella no sabía es que antes de colocar las placas de radio, el médico que le realizó la intervención, el Doctor Lawrence Wharton Jr., tomó una muestra del tumor y otra de

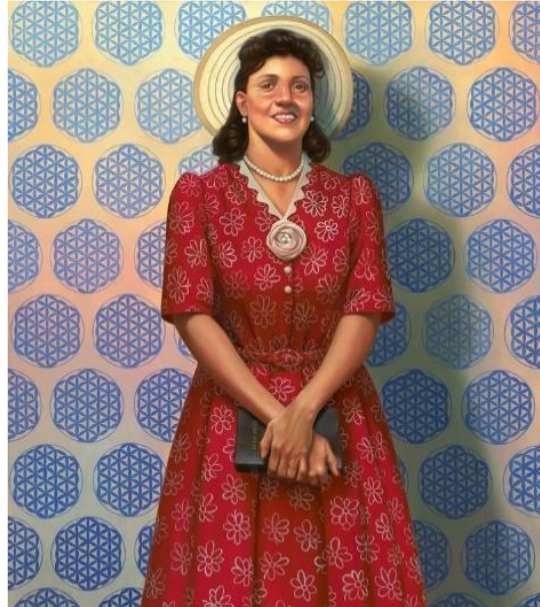


Figura 3. Henrietta Lacks (HeLa) The Mother of Modern Medicine (Nelson, 2017)

tejido sano para enviar al laboratorio del Dr. George Gey (Skloot, 2010). Esto era el protocolo normal en el Johns Hopkins, ya que Gey llevaba años dedicándose a intentar establecer una línea celular inmortal de origen humano que pudiera formar la base para la futura investigación del cáncer.

En el laboratorio de Gey, su asistente Mary Kubicek se dio cuenta que estas células eran diferentes a todas las otras muestras que había cultivado anteriormente, ya que presentaban una velocidad de crecimiento sin precedentes y, además, parecía que no morían y continuaban multiplicándose. Kubicek denominó a las células procedentes de esa muestra “HeLa” por las dos letras iniciales del nombre y apellido de Henrietta Lacks (Nott, 2020a).

Mientras tanto, y a pesar de la radioterapia, el cáncer de Henrietta se expandió tan rápidamente por su cuerpo que en septiembre de 1951 sus órganos estaban cubiertos casi por completo de tumores malignos. Desgraciadamente, Henrietta Lacks murió el 4 de octubre de ese mismo año, apenas unos 10 meses después de su primera visita al hospital (Nott, 2020b).

Como se verá, las células HeLa han sido un pilar muy importante en la ciencia en los últimos setenta años, pero la historia de Henrietta Lacks ha resonado también por su componente bioético. Aunque ella firmó una autorización para que le dieran el tratamiento con radio, en ningún momento accedió a que investigaran sus células. El problema es que en esa época era común estudiar a los pacientes y sus tejidos sin su conocimiento o consentimiento, especialmente si estaban siendo tratados en centros públicos (Etheredge, 2021).

Aunque HeLa se acabó convirtiendo en una de las líneas celulares inmortales más importantes, ni el Johns Hopkins ni el doctor Gey se lucraron económicamente con este descubrimiento, ya que este último envió muestras de las células gratuitamente a compañeros suyos y a laboratorios para que las investigaran (Ambrose, 2017). Aun así, resulta paradójico ver cómo actualmente las células pueden venderse por hasta 600€ el vial y sin embargo la familia de Henrietta Lacks ni siquiera podía permitirse pagar por un seguro médico (Lyapun et al., 2019).

Actualmente en el Johns Hopkins, como en cualquier otro hospital de investigación, se requiere que los pacientes firmen un consentimiento informado en el que acceden a que se utilicen sus tejidos con fines investigativos. Además, se revisa periódicamente el documento para asegurarse de que el lenguaje es comprensible y se utiliza un sistema diferente para nombrar las muestras y así favorecer la confidencialidad del paciente (Manfuso y Desmon, 2011).

En 2013 se generó una controversia cuando se publicó el genoma completo de las células HeLa en una base de datos pública sin el consentimiento de la familia Lacks. Los descendientes de Henrietta consideraban que esto no era ético ya que era posible que se pudiera desvelar información no deseada sobre su familia. Finalmente, se llegó a un acuerdo con el *National Institutes of Health* en el que la familia accedió a que los investigadores tuvieran acceso a estos datos siempre y cuando pidieran permiso a una consejo formado por al menos un miembro de la familia Lacks (Hudson y Collins, 2013).

4.2. Las células HeLa en la investigación científica

El descubrimiento de las células HeLa y su peculiar propiedad de multiplicarse sin fin puso muy pronto de manifiesto el potencial que las mismas tenían para la experimentación y el desarrollo en algunos campos médicos.

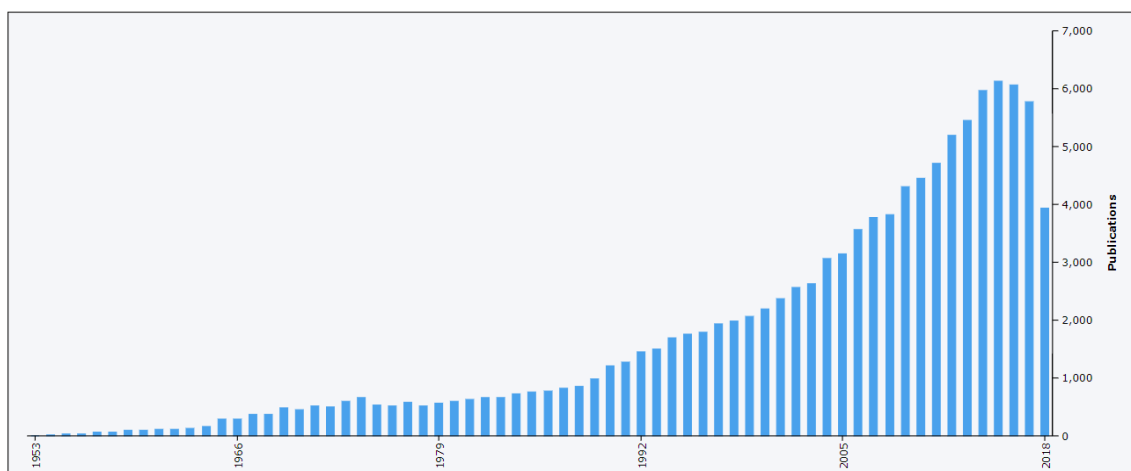


Figura 4. Publicaciones que citan a las células HeLa (National Institutes of Health, 2018)

A pesar de que son células cancerígenas, las HeLa poseen algunas de las características que presentan las células sanas, por lo que resultan muy útiles a la hora de estudiar cómo se comportan las células humanas.

Para empezar a tener una idea del efecto que han tenido las células HeLa en el progreso de la ciencia, sólo hace falta mirar cómo aumenta con el tiempo el número de artículos científicos que citan su uso (fig. 4). Esta tendencia creciente y continua desde su descubrimiento demuestra que, incluso después de casi siete décadas, HeLa sigue siendo una herramienta útil y necesaria para los investigadores (National Institutes of Health, 2018).

A continuación, se exponen las aportaciones más importantes de las células HeLa al desarrollo científico.

4.2.1. Desarrollo de la vacuna de la poliomielitis

La poliomielitis es una enfermedad infecciosa causada por el poliovirus, un enterovirus neurotrópico de la familia *Picornaviridae*. En el caso de la polio, el virus acaba afectando al sistema nervioso central, produciendo debilidad muscular y parálisis.

Las epidemias de poliomielitis empezaron a ocurrir a finales del siglo XIX, pero es probable que los poliovirus existieran desde hace bastante más tiempo. Se cree que la primera representación de la enfermedad causada por este virus se encuentra en la estela funeraria del sacerdote egipcio Ruma que data de alrededor de 1400 AC (fig. 5). En el grabado se puede observar cómo se apoya en un bastón porque su pierna aparece debilitada y atrofiada, con el pie en posición equina (Hansen, 1913).



Figura 5. Estela egipcia del sacerdote Ruma, ca. 1400 A.C.

La primera referencia escrita de la enfermedad se publicó en 1789 en el libro *A Treatise of the Diseases of Children*, escrito por el pediatra inglés Michael Underwood, en el que describía los síntomas de una “debilidad de las extremidades inferiores” que se corresponden inequívocamente con lo que ahora conocemos como poliomielitis (Underwood, 1789).

A principios del siglo XX, las epidemias de poliomielitis empezaron a surgir en países como Estados Unidos (Bolduan, 1917) y Suecia. En este último, entre 1911 y 1913 se diagnosticaron más de 10.000 casos (Axelsson, 2009). En 1908, Karl Landsteiner y Erwin Popper identificaron un virus, más tarde denominado poliovirus, como agente etiológico de la polio, y consiguieron aislarlo (Skern, 2010).

A partir de entonces, comenzaron los intentos por desarrollar una vacuna que consiguiera parar la infección. Los primeros esfuerzos, entre los años 1910 y 1930 tuvieron poco éxito, ya que los resultados eran irregulares e imprevisibles. Más adelante, a comienzos de la década de 1930, destaca la aparición de dos vacunas. En Nueva York, los Doctores Maurice Brodie y M.H. Park idearon un método que consistía en inactivar el poliovirus con formaldehído. A la vez, en Filadelfia, el Doctor John Kolmer intentó producir una vacuna viva atenuada exponiendo el virus a ricinoleato de sodio. Ambas partes administraron su vacuna a miles de niños, pero los ensayos resultaron ser un desastre. Varios murieron de polio, y muchos se pusieron enfermos, tuvieron reacciones alérgicas o acabaron paralizados (Hovern, 2018).

Los siguientes avances para conseguir la inmunización contra la polio llegaron casi 20 años más tarde, ya que después del fracaso de los ensayos de Kolmer y Brodie disminuyeron los intentos de desarrollar una vacuna.

En 1938 se fundó la *National Foundation for Infantile Paralysis* (NFIP), una organización presidida por Basil O'Connor que se encargaba de financiar atención médica a pacientes con polio. Esta fundación estableció comités médicos para otorgar becas a grupos de investigación que estudiaban la virología del poliovirus con el objetivo de conocer mejor su patogénesis y así poder elaborar una vacuna eficaz y segura (Daniel, 2015).

En 1949, Isabel Morgan, David Bodian y Howard Howe, supervisados por Jonas Salk, demostraron que había al menos tres tipos inmunológicos de poliovirus (Mahoney,

Lansing y Leon), caracterizados por su inhabilidad como antígenos de inducir protección contra virus de otro tipo (Bodian et al., 1949). Su trabajo fue crucial para el desarrollo de la vacuna, ya que ésta debería ser capaz de proteger al individuo contra cualquiera de los serotipos del virus.

Hasta ese entonces, toda la investigación referente a la polio se hacía con monos y ratones. Cultivar tejido nervioso de estos animales para hacer crecer el poliovirus era un proceso muy caro y que requería mucho espacio en los laboratorios (Rivers, 1954). Las reglas del juego cambiaron en 1949 cuando John Enders demostró que la cepa Lansing de poliovirus (y más adelante las otras dos) podía ser desarrollada en cultivos de células humanas derivadas de tejido no perteneciente al sistema nervioso (Enders et al., 1949). Esto redujo significativamente el coste y la dificultad de los métodos utilizados para cultivar el poliovirus en grandes cantidades, lo que facilitaría su estudio y permitiría desarrollar la vacuna más adelante.

Además, el trabajo presentado por Enders también demostraba que el poliovirus dañaba a las células y producía un efecto citopático característico y fácilmente visible al examinarlo en el microscopio, lo cual servía como marcador para indicar la presencia del virus. Esto significaba que el cultivo celular podía sustituir la inoculación de monos (el procedimiento que se usaba en ese momento) como método de detección del poliovirus en muestras de pacientes y pruebas serológicas (Horstmann, 1985).

En 1948, Isabel Morgan llevó a cabo un ensayo en monos con una vacuna parecida a la de Brodie, con el virus inactivado con formaldehído. Los resultados demostraron que los anticuerpos inducidos por esta vacuna ayudaban a reducir la frecuencia de monos que acababan paralizados tras una administración del virus activado totalmente (Morgan, 1948). Esto sentaría la base para que Jonas Salk desarrollara su vacuna unos años más tarde.

Salk publicó en el *Journal of the American Medical Association* en 1953 los resultados de su investigación, en los que presentaba una vacuna experimental y describía el proceso de inactivación del virus con formaldehído. Salk probó la vacuna en 161 niños que no dieron muestra alguna de efectos adversos. En este artículo concluía que los niveles de anticuerpos inducidos por la vacuna no mostraban signos de disminución y que dichos niveles eran comparables a aquellos desarrollados tras una exposición natural al virus (fig. 6) (Salk et al., 1953).

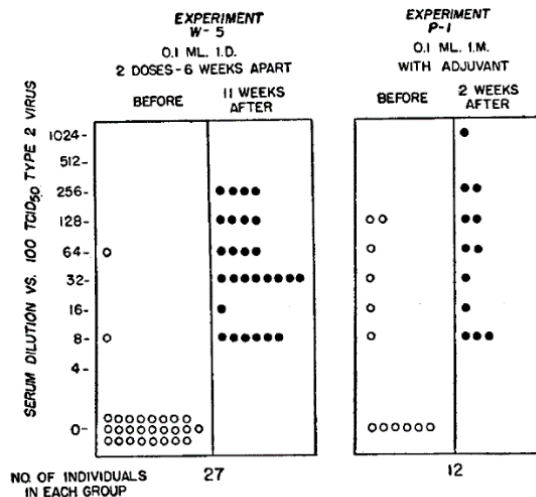


Fig. 15.—Antibody titer for type 2 poliomyelitis virus before and after vaccination in experiment W-5 and experiment P-1.

Figura 6. Nivel de anticuerpos del poliovirus tipo 2 antes y después de la vacunación en los experimentos W-5 y P-1. (Salk et al., 1953)

En enero de 1953, Salk presentó los resultados de su estudio al Comité de Inmunización, una comisión científica que asesoraba a la NFIP. Dados sus resultados, O'Connor comenzó a planear un ensayo a gran escala. Algunos virólogos miembros del comité creían que estos planes eran precipitados, ya que pensaban que una vacuna de virus atenuado sería más efectiva a la hora de crear inmunidad a largo plazo (Meldrum, 1998). A pesar de estas y otras objeciones, O'Connor anunció en noviembre de 1953 que las pruebas comenzarían en primavera del año siguiente, adelantándose a la próxima temporada de polio, que sería en verano. Este programa de vacunación comenzaría en el condado de Allegheny, donde Salk ya había inoculado a unos 700 niños y adultos, y se extendería por otros 200 condados más (News and Comment, 1954).

En un principio se eligieron las células de mono Rhesus para determinar la cantidad de anticuerpos desarrollados tras la administración de la vacuna. Sin embargo, los laboratorios involucrados en el proceso de evaluación de los resultados del estudio requerirían una gran cantidad de células de mono, por lo que apareció la necesidad de una célula hospedadora alternativa (Turner, 2012). En paralelo a estos eventos, George Gey y sus compañeros de la Universidad de Minnesota estudiaban la propagación del poliovirus en células HeLa con muy buenos resultados. Sus experimentos demostraron

que estas células eran extremadamente susceptibles a ser infectadas por los tres serotipos del virus, por lo que podían servir como hospedadoras para la cuantificación y la producción del virus de una manera fácil, económica y efectiva (Scherer et al., 1953).

Las células HeLa fueron seleccionadas como la alternativa a las células de mono y la NFIP decidió establecer un laboratorio productor de HeLa. El centro designado para servir de proveedor de HeLa fue la Universidad de Tuskegee en Alabama. El objetivo de este proyecto era cultivar células HeLa en una escala masiva, evitar contaminación viral y microbiana, mantener las células en condiciones inalteradas y enviar estos cultivos a los laboratorios para que pudieran ser utilizados directamente para evaluar los resultados del estudio (Brown y Henderson, 1983).

En abril de 1954 comenzó el ensayo clínico de la vacuna, que fue iniciado, organizado y financiado por la NFIP al completo. En total, más de 1,3 millones de niños participaron



Figura 7. Titulares de periódicos tras la rueda de prensa de Francis, 1955

en el estudio y fueron conocidos como los “pioneros de la polio”. Fue un ensayo doble-ciego, en el que algunos sujetos recibieron las tres dosis de la vacuna, otros recibieron el placebo y otros sirvieron como grupo de control. Se tardaría casi un año en analizar los resultados del estudio y determinar si la vacuna proporcionaba protección contra la polio (Rose, 2004).

El 12 de abril de 1955, reporteros y científicos de todo el mundo se reunieron en Michigan para escuchar la rueda de prensa que ofreció Thomas Francis, director del Centro de Evaluación de la Vacuna de la Poliomiéltis. En ella comunicó que la vacuna era “segura, efectiva y potente” y que era capaz de prevenir la polio parálitica en un 80 o 90% (The Last Mile: Polio, Salk, and Tommy Francis, 2005). Este fue uno de los ensayos clínicos más relevantes y con más sujetos implicados hasta la fecha. La vacuna de Salk fue autorizada al día siguiente por el gobierno de Estados Unidos y gracias a ella se comenzó el proceso de erradicación de la poliomiéltis (fig. 7).

4.2.2. Radioterapia

Los rayos X de alta energía y las sustancias radioactivas se han usado como tratamiento contra el cáncer desde hace más de cien años. En 1895, Wilhelm Conrad Röntgen descubrió los rayos X de manera accidental mientras hacía experimentos con un tubo de Crookes y una bobina de inducción. Se dio cuenta de que a pesar de que el tubo de cristal estaba cubierto de manera que ninguna luz pudiera atravesarlo, emanaban de él unos rayos irreconocibles. Röntgen llamó a esta radiación misteriosa "X", y pronto descubrió que atravesaba varios materiales e incluso la piel, y que cuando lo



Figura 8. Radiografía de los huesos de la mano de Frau Röntgen (Röntgen, 1895)

hacía, se podían observar los huesos debajo de la misma (fig. 8) (Glasser, 1995). Como reconocimiento por los servicios prestados a la comunidad científica al descubrir estos rayos, Röntgen fue galardonado con el primer premio Nobel de física en 1901.

En enero de 1896, casi un año después de su descubrimiento, los rayos X fueron utilizados por Emil Herman Grubbé para tratar a una paciente con cáncer de mama por primera vez. Grubbé llevaba varios años experimentando con tubos de Crookes, y había desarrollado eritemas y úlceras en su mano izquierda por causa de la exposición a la radiación de forma prolongada. Fue el doctor John Ellis Gilman quien, al ver su mano, sugirió la idea de utilizar estos rayos como tratamiento, señalando que si un agente físico era capaz de provocar tanto daño en células normales, podría ser usado como agente terapéutico para tratar enfermedades en las que un efecto irritativo o incluso destructivo fuese conveniente (Grubbé, 1933).

En 1898, Maria Skłodowska-Curie y su marido Pierre Curie descubrieron el radio y su capacidad de emitir radiación. Tres años más tarde, Curie y Henri Becquerel presentaron un informe sobre los efectos fisiológicos del radio (Becquerel y Curie, 1901). A partir de ese momento, los casos en los que se utilizaban los rayos X y el radio fueron en aumento, siendo los cánceres de piel los que se trataban con mayor frecuencia.

Sin embargo, debido al poco conocimiento que se tenía de la radioterapia y su mecanismo de acción, los resultados de estos tratamientos eran muy malos en comparación con los efectos secundarios. Esto provocó un gran volumen de estudios cuyo objetivo era comprender a fondo este tipo de terapia (Lederman, 1981). Se descubrieron nuevos isótopos radioactivos, tipos de rayos y técnicas radiológicas. Los científicos comenzaron a entender la naturaleza de la radiación y la relación entre el tiempo y la dosis de la radiación y la supervivencia celular (Coutard, 1934).

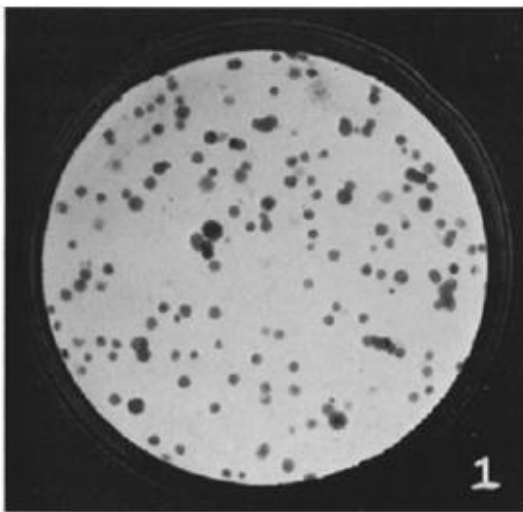


Figura 9. Colonias de HeLa incubadas durante nueve días (Puck y Marcus, 1956)

En cuanto a las células HeLa, su contribución al ámbito de la radioterapia no es tan obvia como en otros campos. En 1956, el doctor Theodore Puck llevó a cabo una serie de estudios en los que se usaron las células HeLa (fig. 9) para determinar cómo la radiación puede dañar a las células, cuál es el impacto de los rayos X en el crecimiento celular y su efecto negativo en la salud humana. En uno de estos estudios se presentaba la evidencia por primera vez

de que el efecto letal de estos rayos puede ser debido a un defecto genético inducido por la radiación y se determinaba la dosis letal media de radiación requerida para matar células de mamífero (Puck y Marcus, 1956). El mismo Puck demostró un año más tarde que las células HeLa irradiadas compartían las mismas características que las células humanas normales (Puck et al., 1957).

Esta serie de experimentos son ampliamente reconocidos como los que revolucionaron el campo de la radiobiología. En los años que siguieron hubo numerosos avances gracias a ellos:

- Se determinó que las células tienen la capacidad de reparar los daños causados por radiaciones subletales (Elkind y Sutton, 1959).
- Se elaboraron las curvas de supervivencia de células sometidas a radiación X, α y β (Barendsen et al., 1960).

- Se encontraron diferencias en la supervivencia de las células dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encontraran (Sinclair y Morton, 1963; Terasima y Tolmach, 1963).
- Se identificaron los efectos de la tasa de dosis, que tienen que ver con la relación entre el impacto de radiación ionizante sobre las células y la cantidad de radiación por unidad de tiempo (Hall y Bedford, 1964).
- Se definió el OER (del inglés Oxygen Enhancement Ratio), que tiene en cuenta la dosis de radiación necesaria para conseguir un determinado efecto con o sin presencia de oxígeno (Barendsen et al., 1966).
- Apareció el concepto de daño potencialmente letal, que es aquel que ocurre cuando la célula se daña de tal forma que puede provocar la muerte a no ser que se comience un proceso de reparación (Phillips y Tolmach, 1966).

Actualmente, la radioterapia es un componente esencial en el control de pacientes oncológicos, ya sea aisladamente o en combinación con cirugía o quimioterapia, tanto curativo como paliativo. De los pacientes oncológicos que se curan, se estima que un 49% es gracias a la cirugía, alrededor de un 40% es por la radioterapia aislada o combinada con otras modalidades y un 11% es por la quimioterapia aislada o combinada (Möller et al., 2003).

4.2.3. Desarrollo de medicamentos anticancerosos

Las células HeLa han sido muy utilizadas en la investigación de fármacos para tratar el cáncer debido a su facilidad para ser cultivadas y a su propia naturaleza cancerígena. A continuación se exponen algunos de los antineoplásicos más importantes a cuyo desarrollo han contribuido.

4.2.3.1. Hidroxiurea

La hidroxycarbamida o hidroxiurea fue sintetizada por primera vez en 1869 por Dresler y Stein (Rees, 2011), aunque no volvió a resurgir hasta 1963 cuando se investigó su posible uso en la leucemia, ya que anteriormente se había demostrado que alteraba la formación de leucocitos. Los resultados indicaron que la hidroxiurea era efectiva contra la leucemia L1210 en ratones (Stearns et al., 1963) y en humanos, en los que se observaba una disminución del número de leucocitos y una reducción del tamaño del bazo (Thurman et al., 1963). Un estudio realizado en 1964 demostró que la hidroxiurea en concentraciones de 5 µg/ml inhibe el crecimiento en cultivos de HeLa en un 50 por ciento (Mohler, 1964).

La hidroxiurea fue aprobada originalmente en 1967 como un fármaco antineoplásico indicado en múltiples cánceres incluido el melanoma, el cáncer de ovario y, más notablemente, la leucemia mieloide crónica (FDA, 2016). En España, la hidroxiurea como anticanceroso está indicada actualmente solo en la leucemia mieloide crónica como pretratamiento o paliativo en casos resistentes, y en combinación con radioterapia para el tratamiento local del carcinoma de cérvix y el carcinoma epidermoide primario de cabeza y cuello (AEMPS, 2021a).

4.2.3.2. Camptotecina

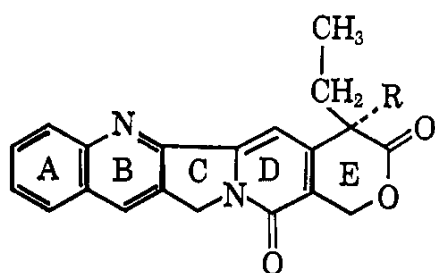


Figura 10. Estructura química de la camptotecina (Wall et al., 1966)

Wall y Wani descubrieron la camptotecina en 1966. Fue aislada del árbol originario de China *Camptotheca acuminata*. Determinaron la estructura química de la molécula (fig. 10) y detectaron una potente acción antileucémica y antitumoral en animales (Wall et al., 1966). Aunque su mecanismo de acción no era conocido, en Estados Unidos la FDA aprobó su uso para ensayos clínicos relacionados con el tratamiento del carcinoma de colon y otros cánceres (Gottlieb et al., 1970). Sin embargo, aunque la camptotecina mostraba una fuerte actividad antitumoral, también

causaba efectos secundarios muy severos e impredecibles, por lo que se interrumpieron los ensayos en 1972 cuando se encontraban en la fase II (Li et al., 2017).

La camptotecina volvió a ganar popularidad cuando en la década de 1980 se descubrió que su diana farmacológica es la topoisomerasa tipo I y que el fármaco actúa inhibiéndola. Este estudio, que se realizó en células HeLa, sería verificado posteriormente por investigaciones que demostraban que la camptotecina puede limitar el crecimiento celular incontrolable en células cancerígenas (Hsiang et al., 1985).

Los organismos reguladores de distintos países no tardaron en aprobar su uso en clínica. En 1994 se aprobó en Japón el irinotecán (Irinotecan First Launch in Japan, 1994) y en 1996 se aprobó en Estados Unidos el topotecán (FDA, 2014), ambos derivados de la camptotecina. En España está indicado su uso para cáncer colorrectal y cáncer de pulmón (AEMPS, 2021b, 2021c).

4.2.3.3. Talidomida

La talidomida fue sintetizada por primera vez en 1954 por la compañía farmacéutica suiza Ciba. En un principio se utilizaba como sedante y antiemético en el embarazo (Franks et al., 2004). Sin embargo, el uso de este fármaco resultó ser una de las mayores tragedias en la historia del desarrollo de medicamentos. Fue comercializada en más de cuarenta países, y por causa de sus efectos teratogénicos, desconocidos hasta el momento, más de 10.000 niños nacieron con defectos congénitos. La talidomida fue retirada del mercado en 1961 (Thalidomide, 2019).

En los años que siguieron se descubrió que la talidomida tenía efectos inmunomoduladores y que era efectiva contra la lepra lepromatosa (Sheskin, 1980), enfermedades autoinmunes (Calabrese y Fleischer, 2000), y que dificultaba o incluso revertía el síndrome de desgaste característico en pacientes con VIH (Reyes-Terán et al., 1996).

El uso de la talidomida en cáncer comenzó cuando se descubrió que inhibía la angiogénesis (D'Amato et al., 1994), por lo que se estudió su eficacia en el mieloma múltiple refractario y se observó que era muy efectiva, ya que la angiogénesis es el

proceso esencial que causa la proliferación descontrolada de células en la médula ósea de los pacientes con esta enfermedad (Singhal et al., 1999). En 2010, el potencial antiangiogénico de la talidomida fue demostrado en humanos usando células HeLa. En el mismo estudio, se descubrió uno de los principales mecanismos que causan la teratogenicidad en mamíferos, lo que podría permitir el desarrollo de derivados de la talidomida efectivos sin actividad teratogénica (Ito et al., 2010). En la actualidad, en España está aprobado un derivado de la talidomida denominado pomalidomida, y está indicado en el tratamiento del mieloma múltiple (AEMPS, 2021d).

4.2.4. Desarrollo de la vacuna del VPH

El cáncer de cuello uterino es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en mujeres de todo el mundo, y se estima que más del 95% de ellos están causados por el virus del papiloma humano o VPH (Organización Mundial de la Salud, 2022).

A finales de los años 70 y principios de los 80 aparecieron los primeros estudios en los que se establecía una posible relación entre el virus del papiloma humano y el cáncer de cuello uterino o cervical (zur Hausen, 1976). Uno de los mayores contribuyentes a este tema ha sido el virólogo alemán Harald zur Hausen, que ganó el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2008 por “el descubrimiento de los virus del papiloma humano causantes del cáncer cervical”. En 1982 se publicaron varios estudios que identificaban secuencias de ADN de VPH tipo 6 en tumores genitales humanos (Gissmann et al., 1982). En años posteriores se detectaron también ADN de VPH de los tipos 11 y 16 en diferentes biopsias de cáncer cervicouterino (Durst et al., 1983).

Uno de los estudios más interesantes fue publicado en 1984 por el equipo de zur Hausen. En él se identificó un nuevo tipo de VPH (tipo 18) en biopsias de diferentes tumores y, además, se detectó ADN de este mismo tipo de virus en la línea celular HeLa (Boshart et al., 1984). Se determinó también que los VPH 16 y 18 son los tipos más oncogénicos y que, entre ambos, causan más del 70% de los cánceres cervicales (Muñoz et al., 2003).

En 1991, Jian Zhou y su equipo de la Universidad de Queensland descubrieron que las proteínas L1 y L2 (fig. 11) de la cubierta del VPH 16, al aislarse, eran capaces de agruparse y formar una estructura parecida a la cápside del virus. Esto pasó a llamarse partícula similar a virus (VLP, por sus siglas en inglés) (Zhou et al., 1991). La ventaja de las VLP es que aunque no

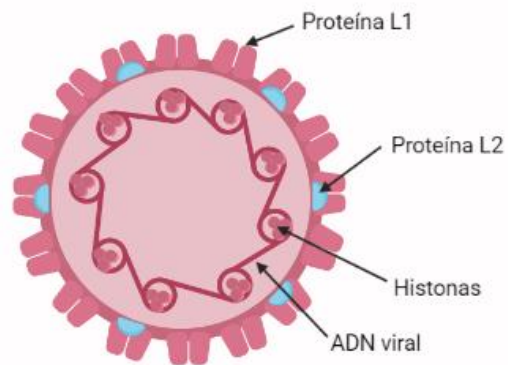


Figura 11. Estructura del virus del papiloma humano (Elaboración propia en biorender.org)

contienen ADN del virus, son capaces de inducir una respuesta inmune en el organismo. Posteriormente se demostró que los anticuerpos generados en respuesta a las VLP eran efectivos a la hora de neutralizar el virus en conejos y perros (Ghim et al., 2000; Oise Breitburd et al., 1995).

Una vez demostrada su eficacia en animales, comenzaron los estudios en humanos. Estos mostraron que el nivel de anticuerpos generado tras la administración de la vacuna era aproximadamente cuarenta veces mayor al que se obtiene con inmunidad natural. Por lo general, estos estudios indicaron que las vacunas VLP de VPH era seguras, bien toleradas y altamente inmunogénicas (Evans et al., 2001).

Finalmente, tras numerosas pruebas y ensayos clínicos, la vacuna Gardasil fue aprobada en Australia y Estados Unidos en 2006, y un año más tarde, en otros ochenta países (Noman, 2020).

4.2.5. Otras aportaciones

Desde su descubrimiento, las células HeLa se han utilizado en un sinnúmero de estudios. Además de los mencionados anteriormente, hay muchos otros acontecimientos importantes en la investigación científica que han sido posibles gracias a estas células. A continuación se exponen algunos de ellos.

- En 1952, un accidente en un estudio con células HeLa permitió que años más tarde se determinara que las células humanas no tienen cuarenta y ocho cromosomas como era la creencia hasta ese momento, si no cuarenta y seis (Arduengo, 2010)
- En 1964, las células HeLa fueron a bordo de una de las primeras cápsulas usadas para estudiar el espacio exterior, con la finalidad de estudiar cómo las células humanas reaccionan a la radiación y a la gravedad cero (Zhukov-Verezhnikov et al., 1964).
- En un artículo publicado en 1973 los investigadores se dieron cuenta de que las células HeLa permitían llevar a cabo estudios rápidos y económicos sobre cómo *Salmonella typhimurium* infecta las células humanas (Giannella et al., 1973).
- Al comienzo de la pandemia de VIH/SIDA, se descubrió que el VIH no infectaba fácilmente a las células HeLa. Esto ayudó a entender el mecanismo de infección del VIH y sentó las bases para el desarrollo de fármacos contra este virus (Maddon et al., 1988).
- En 1989, un experimento con células HeLa sentó las bases para el entendimiento de cómo la telomerasa fabrica los telómeros y protege al cromosoma de la degradación tras la división celular (Morin, 1989). Además, tras este descubrimiento, nació la teoría de que estas células no mueren porque su telomerasa reconstruye los telómeros durante la división celular, permitiendo así su proliferación indefinida (Ronson, 2017).
- En 1993, las células HeLa junto con una *E. coli* recombinada permitieron detectar cuál era el gen causante de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Aldhous, 1993).
- En 2011, se utilizó la línea celular HeLa (entre otras) para identificar que la proteína NPC1 en humanos podría ser utilizada como diana farmacológica a la hora de desarrollar medicamentos para combatir el virus del Ébola (Côté et al., 2011).
- En 2014, las células HeLa se usaron en un estudio en el que se descubrieron dos sustancias que podrían ayudar a disminuir la degeneración neuronal y se identificaron como un posible tratamiento para la enfermedad de Parkinson (Toyoda et al., 2014).

- Desde 2020, las células HeLa se han utilizado en numerosas ocasiones durante la pandemia de COVID-19. En el pionero estudio que identificaba el mecanismo de infección del virus SARS-Cov-2 en humanos se usaron células HeLa (Zhou et al., 2020). También se recurrió a ellas para estudiar la susceptibilidad de las células a ser infectadas por el SARS-Cov-2, los receptores y las vías de entrada de este virus y para identificar posibles dianas farmacológicas del mismo (Ou et al., 2020).

5. Conclusiones

La historia de Henrietta Lacks debe servir como ejemplo a la comunidad científica a la hora de tener en cuenta la autonomía de los sujetos de la investigación humana. Es importante que los pacientes estén bien informados y que su consentimiento conste claramente. Ciertamente, esto forma parte de un debate que debe seguir a la orden del día para asegurar que los derechos de los participantes estén protegidos pero que a su vez no se detenga el avance científico.

Desde su establecimiento como línea celular en 1952, HeLa ha sido utilizada en infinidad de ocasiones gracias a sus peculiares características. En ningún momento ha disminuido su uso, de hecho se ha ido incrementando con los años. Estas células continúan siendo un recurso muy importante en laboratorios de todo el mundo.

El campo de la virología ha sido uno de los más favorecidos por las células HeLa. La mayoría de los virus las infectan fácilmente por lo que resulta relativamente sencillo conocer su mecanismo de infección y estudiarlos. Otros campos como la investigación del cáncer también se han visto muy influenciados por esta línea celular, gracias a la cual se han creado vacunas y desarrollado medicamentos.

El valor de las células HeLa no puede ser subestimado. Desde la elaboración de fármacos a la investigación de nuevas enfermedades y hasta experimentos en gravedad cero, HeLa ha sido la línea celular humana de elección en la investigación biomédica.

La bibliografía disponible sobre las células HeLa es abundante y extensa, por lo que tratar de abarcar todas sus contribuciones en este TFG resulta complicado, sobre todo si se quiere hablar de ellas en profundidad.

6. Bibliografía

AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios). Ficha Técnica Hydrea 500 mg cápsulas duras. 2021a.

AEMPS. Ficha Técnica Hycamtin 1 mg Cápsulas Duras. 2021b.

AEMPS. Ficha Técnica Irinotecan Hospira 20 mg/ml Concentrado para Solución para Perfusión EFG. 2021c.

AEMPS. Ficha Técnica Imnovid 3 mg Cápsulas Duras. 2021d.

Aldhous P. Breaking the code for the tuberculosis invasion. *Science*. 1993; 261(5127): 1390.

Ambrose CT. An amended history of tissue culture: Concerning Harrison, Burrows, Mall, and Carrel. *J Med Biogr*. 2019; 27(2): 95–102.

Ambrose CT. The Tissue Culture Laboratory of Dr. George Otto Gey 60 yrs ago as recalled by a former student. *In Vitro Cell Dev An*. 2017; 53(5): 467–73.

Arduengo M. Sloppy Technicians and the Progress of Science. *Promega Connections*. 2010. [en línea]. [Consultado en Mayo 2022]. Disponible en: <https://www.promegaconnections.com/sloppy-technicians/>

Axelsson P. “Do not eat those apples; they’ve been on the ground!”: polio epidemics and preventive measures, Sweden 1880s-1940s. *Asclepio*. 2009; 61(1): 23–38.

Barendsen GW, Beusker TL, Vergroesen AJ, Budke L. Effects of different radiations on human cells in tissue culture. II. Biological experiments. *Radiat Res*. 1960; 13(6): 841–9.

Barendsen GW, Koot CJ, van Kersen GR, Bewley DK, Field SB, Parnell CJ. The effect of oxygen on impairment of the proliferative capacity of human cells in culture by ionizing

radiations of different LET. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1966; 10(4): 317–27.

Becquerel H, Curie P. Action Physiologique des Rayons du Radium. *Compt Rend Acad Sci.* 1901; 132: 1289–91.

Bodian D, Morgan IM, Howe HA. Differentiation of types of poliomyelitis viruses: III. The grouping of fourteen strains into three basic immunological types. *Am J Epidemiol.* 1949; 49(2): 234–47.

Bolduan CF. What We Have Learned from the New York Epidemic of Poliomyelitis. *Am J Public Health (N Y).* 1917; 7(1): 86–90.

Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984; 3(5): 1151.

Brown RW, Henderson JH. The mass production and distribution of HeLa cells at Tuskegee Institute, 1953-55. *J Hist Med Allied Sci.* 1983; 38(4): 415–31.

Calabrese L, Fleischer AB. Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am J Med.* 2000; 108(6): 487–95.

Carrel A. On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med.* 1912; 15(5): 528.

Carrel A, Burrows MT. Cultivation of tissues in vitro and its technique. *J Exp Med.* 1911; 13(3): 387–96.

Côté M, Misasi J, Ren T, Bruchez A, Lee K, Filone CM, et al. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature.* 2011; 477(7364): 344–8.

Coutard H. Principles of X-Ray Therapy of Malignant Diseases. *Lancet.* 1934; 224(5784): 1–8.

Cruickshank CND, Lowbury EJJ. Effect of Antibiotics on Tissue Cultures of Human Skin. *Brit Med J.* 1952; 2(4793): 1070–2.

D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(9): 4082–5.

Daniel JW. Basil O'Connor, the National Foundation for Infantile Paralysis and the Reorganization of Polio Research in the United States, 1935-41. *J Hist Med Allied Sci*. 2015; 70(3): 394–424.

Delgadillo Álvarez DM del C. Cultivos celulares: reducción histórica en el uso de animales de laboratorio. *Revista Fesahanccal*. 2021; 7(1): 17–24.

Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80(12): 3812–5.

Earle WR, Schilling EL, Stark TH, Straus NP, Brown MF, Shelton E. Production of Malignancy in Vitro. IV. The Mouse Fibroblast Cultures and Changes Seen in the Living Cells. *J Natl Cancer I*. 1943; 4(2): 165–212.

Elkind MM, Sutton H. X-Ray Damage and Recovery in Mammalian Cells in Culture. *Nature*. 1959; Vol: 184(4695): 1293–5.

Enders JF, Weller TH, Robbins FC. Cultivation of the Lansing Strain of Poliomyelitis Virus in Cultures of Various Human Embryonic Tissues. *Science*. 1949; 109(2822): 85–7.

Etheredge L. Henrietta Lacks. *Encyclopedia Britannica*. 2021. [en línea]. [Consultado en Marzo 2022]. Disponible en: <https://www.britannica.com/biography/Henrietta-Lacks>

Evans TG, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Demeter L, Suzich JAA, et al. A Phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis*. 2001; 183(10): 1485–93.

FDA (Food and Drug Administration). HYDREA (hydroxyurea) capsules, for oral use. Princeton: Bristol-Myers Squibb Company: 2016.

FDA. Topotecan Injection, for Intravenous Use. Sellersville: Teva Pharmaceuticals USA: 2014.

Fischer A. Tissue culture : studies in experimental morphology and general physiology of tissue cells in vitro. London: Heinemann; 1925.

Franks ME, Macpherson GR, Figg WD. Thalidomide. *Lancet*. 2004; 363(9423): 1802–11.

Freshney I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 7th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2016.

Ghim SJ, Newsome J, Bell J, Sundberg JP, Schlegel R, Jenson AB. Spontaneously Regressing Oral Papillomas Induce Systemic Antibodies That Neutralize Canine Oral Papillomavirus. *Exp Mol Pathol*. 2000; 68(3): 147–51.

Giannella RA, Washington O, Gemski P, Formal SB. Invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: a model for study of invasiveness of *Salmonella*. *J Infect Dis*. 1973; 128(1): 69–75.

Gissmann L, de Villiers E, zur Hausen H. Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papillomavirus type 6 DNA. *Int J Cancer*. 1982; 29(2): 143–6.

Glasser O. W. C. Roentgen and the discovery of the Roentgen rays. *Am J Roentgenol*. 1995; 165(5): 1033–40.

Gottlieb JA, Guarino AM, Call JB, Oliverio VT, Block JB. Preliminary pharmacologic and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880). *Cancer Chemoth Rep Part 1*. 1970; 54(6): 461–70.

Grubbé EH. Priority in the Therapeutic Use of X-rays. *Radiology*. 1933; 21(2): 156–62.

Hall EJ, Bedford JS. Dose Rate: Its Effect on the Survival of HeLa Cells Irradiated with Gamma Rays. *Radiat Res*. 1964; 22(2): 305–15.

Hansen E. A probable case of infantile paralysis in ancient Egypt. *Univ Md Bull*. 1913; 8(192): 94.

Harrison RG. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1906; 4(1): 140–3.

zur Hausen H. Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer. *Cancer Res*. 1976; 36(2): 794.

Hay RJ, Strehler BL. The limited growth span of cell strains isolated from the chick embryo. *Exp Gerontol.* 1967; 2(3): 123–35.

Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25(3): 585–621.

Hoffman RM. *The Beginning of Tissue Culture.* Elsevier. 2016. [en línea]. [Consultado en Febrero 2022]. Disponible en: <https://scitechconnect.elsevier.com/the-beginning-of-tissue-culture/>

Horstmann DM. The Poliomyelitis Story: A Scientific Hegira. *Yale J Biol Med.* 1985; 58: 79–90.

Hovern D. *The Trials and Triumphs of the American Polio Vaccine The Trials and Triumphs of the American Polio Vaccine Introduction.* Cooper Med Sch Rowan Univ Capstone Proj. 2018; 4.

Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem.* 1985; 260(27): 14873–8.

Hudson KL, Collins FS. Family matters. *Nature.* 2013; 500(7461): 141.

Irinotecan First Launch in Japan. *The Pharma Letter.* 1994. [en línea]. [Consultado en Mayo 2022]. Disponible en: <https://www.thepharmaletter.com/article/irinotecan-first-launch-in-japan>

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science (1979).* 2010; 327(5971): 1345–50.

Jones H. Record of the first physician to see Henrietta Lacks at the Johns Hopkins Hospital: history of the beginning of the HeLa cell line. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 176(6).

Jones HW, McKusick PS, Harper PS, Wu KD. George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Am J Obstet Gynecol.* 1971; 38(6): 945–9.

Lederman M. The early history of radiotherapy: 1895–1939. *Int J Radiat Oncol.* 1981; 7(5): 639–48.

Li F, Jiang T, Li Q, Ling X. Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top1) as their mechanism of action: did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer?. *Am J Cancer Res.* 2017; 7(12): 2350.

Lyapun IN, Andryukov BG, Bynina MP. HeLa Cell Culture: Immortal Heritage of Henrietta Lacks. *Mol Genet Microbiol+.* 2019; 34(4): 195–200.

Maddon PJ, McDougal JS, Clapham PR, Dalgleish AG, Jamal S, Weiss RA, et al. HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4. *Cell.* 1988; 54(6): 865–74.

Manfuso J, Desmon S. Honoring the Henrietta Lacks Legacy at Hopkins. *Hopkins Medicine Magazine.* 2011. [en línea]. [Consultado en Mayo 2022]. Disponible en: https://www.hopkinsmedicine.org/news/publications/hopkins_medicine_magazine/archives/springsummer_2011/web_extra_honoring_the_henrietta_lacks_legacy_at_hopkins

Meldrum M. “A calculated risk”: the Salk polio vaccine field trials of 1954. *Brit Med J.* 1998; 317(7167): 1233.

Miller DJ. Sydney Ringer; physiological saline, calcium and the contraction of the heart. *J Physiol.* 2004; 555(3): 585–7.

Mohler WC. Cytotoxicity of Hydroxyurea (NSC-32065) Reversible by Pyrimidine Deoxyribosides in a Mammalian Cell Line Grown in vitro. *Cancer Chemoth Rep.* 1964; 34: 1–6.

Möller TR, Brorsson B, Ceberg J, Frödin JE, Lindholm C, Nylén U, et al. A prospective survey of radiotherapy practice 2001 in Sweden. *Acta Oncol.* 2003; 42(5–6): 387–410.

Morgan IM. Immunization of monkeys with formalin-inactivated poliomyelitis viruses. *Am J Hyg.* 1948; 48(3): 394–406.

Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell.* 1989; 59(3): 521-9.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K v., et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New Engl J Med*. 2003; 348(6): 518–27.

National Institutes of Health (NIH). Publications Involving HeLa Cells. National Institutes of Health. 2018. [en línea]. [Consultado en Abril 2022]. Disponible en: <https://osp.od.nih.gov/scientific-sharing/hela-cells-publications/>

NIH. Significant Research Advances Enabled by HeLa Cells. National Institutes of Health. 2018. [en línea]. [Consultado en Febrero 2022]. Disponible en: <https://osp.od.nih.gov/scientific-sharing/hela-cells-timeline/>

News and Comment. *AMA Am J Dis Child*. 1954; 87(1): 117–8.

Noman. The history of the HPV vaccine 2020. [en línea]. [Consultado en Mayo 2022]. Disponible en: <https://www.nomancampaign.org/post/the-history-of-the-hpv-vaccine>

Nott R. HeLa Cell Line. *The Embryo Project Encyclopedia*. 2020a. [en línea]. [Consultado en Febrero 2022]. Disponible en: <https://embryo.asu.edu/pages/hela-cell-line>

Nott R. Henrietta Lacks (1920–1951). *Embryo Project Encyclopedia*. 2020b. [en línea]. [Consultado en Marzo 2022]. Disponible en: <https://embryo.asu.edu/pages/henrietta-lacks-1920-1951>

Oise Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trin-Dinh-Desmarquet C, Orth GR, et al. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol*. 1995; 69(6): 3959–63.

Organización Mundial de la Salud. Cáncer cervicouterino. WHO. 2022. [en línea]. [Consultado en Mayo 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>

Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Commun*. 2020; 11(1): 1–12.

Phillips RA, Tolmach LJ. Repair of Potentially Lethal Damage in X-Irradiated HeLa Cells. *Radiat Res.* 1966; 29(3): 413–32.

Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med.* 1956; 103(5): 653–66.

Puck TT, Morkovin D, Marcus PI, Cieciora SJ. Action of x-rays on mammalian cells. II. Survival curves of cells from normal human tissues. *J Exp Med.* 1957; 106(4): 485–500.

Rees DC. The rationale for using hydroxycarbamide in the treatment of sickle cell disease. *Haematologica.* 2011; 96(4): 491.

Reyes-Terán G, Sierra-Madero JG, Martínez Del Cerro V, Arroyo-Figueroa H, Pasquetti A, Calva JJ, et al. Effects of thalidomide on HIV-associated wasting syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *AIDS.* 1996; 10(13): 1501–7.

Rivers TM. The Story of Research on Poliomyelitis. *Proc Am Philos Soc.* 1954; 98(4): 250–4.

Ronson J. The Real Science of Henrietta Lacks's Immortal Cells. *Inverse.* 2017. [en línea]. [Consultado en Mayo 2022]. Disponible en: <https://www.inverse.com/article/31538-henrietta-lacks-immortal-cells-cervical-cancer>

Rose D. David Rose, March of Dimes archivist, describes the 1954 Salk polio vaccine trial [vídeo]. *March of Dimes Archives.* 2004. [en línea]. [Consultado en Abril 2022]. Disponible en: https://www.historyofvaccines.org/timeline#EVT_100324

Rous P, Jones FS. A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. *J Exp Med.* 1916; 23(4): 549–56.

Salk JE, Bennett BL, Lewis LJ, Ward EN, Youngner JS. Studies in Human Subjects on Active Immunization Against Poliomyelitis. *J Am Med Assoc.* 1953; 151(13): 1081–98.

Sanford KK, Earle WR, Likely GD. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst.* 1948; 9(3): 229–46.

Sheskin J. The Treatment of Lepra Reaction In Lepromatous Leprosy. *Int J Dermatol.* 1980; 19(6): 318–22.

Sinclair WK, Morton RA. Variations in X-Ray Response During the Division Cycle of Partially Synchronized Chinese Hamster Cells in Culture. *Nature*. 1963; 199(4899): 1158–60.

Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1999; 341(21): 1565–71.

Skern T. 100 years poliovirus: from discovery to eradication. A meeting report. *Arch Virol*. 2010; 155(9): 1371–81.

Skloot R. *The Immortal Life of Henrietta Lacks*. Nueva York: Crown Publishers; 2010.

Stearns B, Losee KA, Bernstein J. Hydroxyurea. A New Type of Potential Antitumor Agent. *J Med Chem*. 1963; 6(2): 201.

Terasima T, Tolmach LJ. Variations in Several Responses of HeLa Cells to X-Irradiation during the Division Cycle. *Biophys J*. 1963; 3(1): 11.

Thalidomide. Science Museum. 2019. [en línea]. [Consultado en Mayo 2022]. Disponible en: <https://www.sciencemuseum.org.uk/objects-and-stories/medicine/thalidomide>

The Last Mile: Polio, Salk, and Tommy Francis. University of Michigan School of Public Health; 2005.

Thurman WG, Bloedow C, Howe CD, Levin WC, Davis P, Lane M, et al. A phase I study of hydroxyurea. *Cancer Chemoth Rep*. 1963; 29: 103–7.

Toyoda Y, Erkut C, Pan-Montojo F, Boland S, Stewart MP, Müller DJ, et al. Products of the Parkinson's disease-related glyoxalase DJ-1, D-lactate and glycolate, support mitochondrial membrane potential and neuronal survival. *Biol Open*. 2014; 3(8): 777–84.

Turner T. Development of the Polio Vaccine: a Historical Perspective of tuskegee university's role in mass Production and distribution of Hela cells. *J Health Care Poor Underserved*. 2012; 23(4): 5–10.

Underwood M. Debility of the Lower Extremities. In: Mathews J, editor. *A Treatise on the Diseases of Children*, vol. 2, Londres: 1789, p. 53–7.

Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA. Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc.* 1966; 88(16): 3888–90.

Witkowski JA. Dr. Carrel's immortal cells. *Med Hist.* 1980; 24(2): 129.

Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol.* 2017; 16(2): 99–117.

Zhukov-Verezhnikov N, et al. Results of microbiological and cytological investigations on Vostok type spacecraft. vol. NASA TT F-281. National Aeronautics and Space Administration; 1964.

Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology.* 1991; 185(1): 251–7.

Zhou P, Yang X lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020 579:7798. 2020; 579(7798): 270–3.