

PONIENDO EN CLARO

Células troncales y reprogramación celular

Marta Martín-López¹, María C. Marín² y Margarita Marqués³

1. Instituto de Biomedicina (IBIOMED), Universidad de León.
2. Instituto de Biomedicina (IBIOMED) y Dpto. de Biología Molecular, Universidad de León.
3. Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) y Dpto. de Producción Animal, Universidad de León.

A partir de diferentes estadios del desarrollo embrionario murino, es posible establecer *in vitro* cultivos de células troncales que presentan dos rasgos distintivos: su capacidad para proliferar indefinidamente, dando lugar a nuevas células troncales (auto-renovación), y su capacidad de diferenciación a todos los tipos celulares que forman el organismo adulto (pluripotencia). Durante décadas, el tránsito del estado pluripotente al estado de diferenciación terminal fue considerado irreversible; sin embargo, en la actualidad es posible revertir este proceso e inducir la pluripotencia en células somáticas mediante la expresión de factores de transcripción que regulan la identidad de las células troncales embrionarias. Este proceso, denominado reprogramación celular, da lugar a la generación de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs), que presentan características moleculares y funcionales similares a las de células troncales embrionarias (ESCs). Por ello, las células reprogramadas son una valiosa herramienta en Biomedicina, y están siendo empleadas para modelar enfermedades humanas o para la búsqueda de nuevos tratamientos en patologías que no responden a los enfoques clínicos tradicionales.

Palabras clave: Pluripotencia, ESCs, iPSCs, Oct4-Sox2-Klf4-Myc, p73, biomedicina.

Introducción

El desarrollo embrionario de mamíferos es un proceso que comienza tras la fecundación del ovocito y la formación del cigoto, y termina con el establecimiento de todos los tejidos especializados que forman el nuevo individuo. Por ello, en estadios tempranos del desarrollo, deben existir en el embrión células con la capacidad para generar todos los tipos celulares que componen el organismo. La potencialidad de estas células, conocidas como células troncales, se irá restringiendo a lo largo del desarrollo, a medida que se determina el “destino” celular (*cell fate*) y se ejecutan programas de diferenciación específicos, regulados a nivel genético y epigenético (Seah, M. 2018).

Forma de mencionar este artículo: Martín-López, M., Marín, M.C., Marqués, M. 2018, Células troncales y reprogramación celular. AmbioCiencias, 16, 25-37. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

De acuerdo con esa potencialidad, existen varios términos para clasificar las poblaciones de células troncales que surgen durante el desarrollo (Klimczewska, 2018). Conviene destacar que sólo el cigoto y los blastómeros embrionarios de estadios tempranos son considerados inequívocamente **totipotentes**, es decir, retienen la capacidad de dar lugar a todos los tejidos embrionarios y a los extraembrionarios, como la placenta. En el embrión, las células de la masa celular interna (ICM) del blastocisto y las del epiblasto se caracterizan por ser **pluripotentes**, puesto que son capaces de originar todos los tipos celulares de las tres capas germinales embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo), pero no el linaje trofoblástico extraembrionario. En estadios posteriores del desarrollo fetal y en los organismos adultos, las células troncales que residen en los tejidos tienen una potencialidad más restringida, pudiendo sólo diferenciarse a tipos celulares de alguna de las tres capas germinales, por lo que se definen como **multipotentes**. Estas células troncales adultas (ASCs) se localizan en microambientes especializados, denominados nichos, y tienen como función el mantenimiento de la homeostasis tisular a lo largo de la vida de los organismos (Rezza *et al.*, 2014).

Células troncales pluripotentes derivadas del embrión de ratón

Aunque la pluripotencia de las células embrionarias es sólo un estado transitorio *in vivo* durante la embriogénesis temprana (Wu *et al.*, 2016), es posible establecer y mantener *in vitro* cultivos de células troncales pluripotentes (PSCs) a partir de diferentes estadios del desarrollo embrionario (**Fig. 1**). Además de su pluripotencia, estas células presentan como rasgo distintivo su capacidad de auto-renovación, gracias a la cual pueden proliferar indefinidamente *in vitro* dando lugar a nuevas células troncales, manteniéndose en un estado no diferenciado mediante condiciones específicas de cultivo.

La derivación de las primeras líneas de células troncales embrionarias (ESCs) se produjo en 1981, a partir de la ICM de blastocistos pre-implantación de ratones de la cepa 129 (Evans y Kaufman, 1981). Las líneas de células troncales epiblasticas (EpiSCs) se derivaron dos décadas más tarde (Brons *et al.*, 2007), a partir de epiblastos post-implantación, y reflejan un estado de pluripotencia más cercano al de la fase de gastrulación. Finalmente, las líneas de células germinales embrionarias o EGCs se establecen a partir de las células germinales primordiales (PGCs), en torno al día 8,5-12,5 del desarrollo embrionario (Matsui *et al.*, 1992).

Además de la clasificación convencional de las PSCs en función del estadio embrionario en el que se derivan, se ha definido la existencia de un estado de

pluripotencia *naive*, representativo de la ICM del blastocisto, y otro estado *primed*, que recapitula las características de desarrollo del embrión post-implantación (Wu y Izpisua Belmonte, 2015). Los estados *naive* y *primed* proporcionan, respectivamente, a las ESCs y las EpiSCs murinas distintas características a nivel de morfología, expresión génica, y estado epigenético (Takahashi *et al.*, 2018). Cada estado depende de diferentes vías de señalización y también difieren en la capacidad de generación de quimeras (las EpiSCs contribuyen ineficientemente a su formación cuando se inyectan en blastocistos, aunque sí forman embriones quiméricos al ser inyectadas en epiblastos E7,5). Es importante destacar que estos dos estados de pluripotencia no son compartimentos estanco, sino que las células pueden transitar entre ellos de forma reversible, en función de las condiciones de cultivo (Weinberger *et al.*, 2016), habiéndose propuesto la existencia de estados alternativos intermedios entre los anteriores (Kalkan y Smith, 2014; Du *et al.*, 2018).

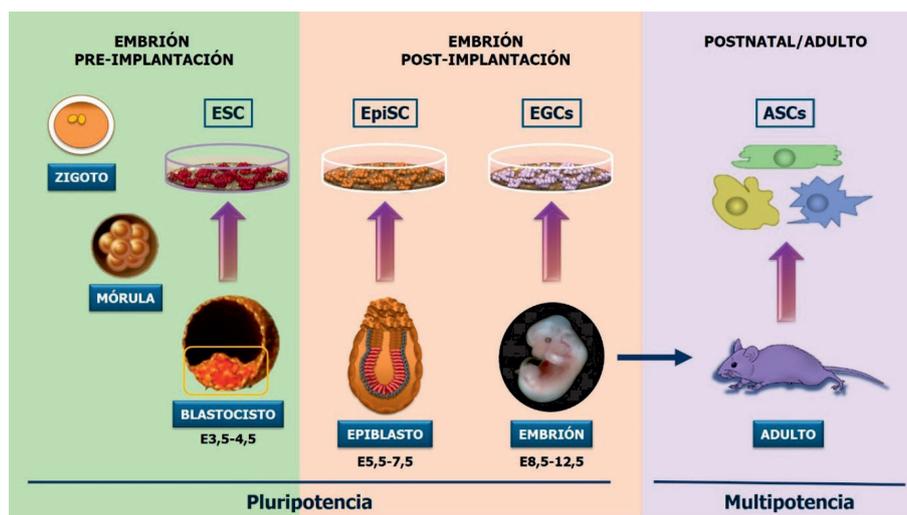


Figura 1. Origen de las células troncales pluripotentes durante el desarrollo embrionario (Martín-López, Tesis Doctoral, 2017).

Caracterización de las células pluripotentes

La descripción de las PSCs únicamente en base a criterios morfológicos resulta insuficiente, por lo que es esencial disponer de análisis que permitan caracterizar la autorenovación y pluripotencia de las PSCs, tanto *in vitro* como *in vivo*. La caracterización en términos moleculares de la identidad de las ESCs (*stemness*) requiere determinar la activación de los programas transcripcionales y de las vías de señalización que regulan estos procesos. Junto con estos análisis genéticos, existen diversos ensayos para comprobar la capacidad de diferenciación de las PSCs, que aparecen recogidos en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Ensayos utilizados para evaluar la pluripotencia de las PSCs.

	Ensayo	Abordaje Experimental
In vitro	Diferenciación mediante la formación de cuerpos embrioides (EBs)	Las PSCs se cultivan en suspensión, formando agregados multicelulares con forma esférica o EBs que recapitulan los primeros estadios del desarrollo embrionario. Mediante análisis de la expresión de marcadores específicos se confirma que las PSCs pueden diferenciarse a cualquier tipo celular de origen ectodérmico, mesodérmico o endodérmico
In vivo	Formación de teratomas	Las PSCs se inyectan subcutáneamente en ratones inmunodeficientes, que desarrollan tumores. Mediante análisis histopatológico, se confirma que los tumores contienen células diferenciadas pertenecientes a las tres capas germinales
	Generación de ratones quiméricos y contribución a la línea germinal	Las PSCs se inyectan en blastocistos de ratón, donde deben incorporarse a la ICM del blastocisto y dar lugar al nacimiento de quimeras, contribuyendo a todos los tejidos del organismo. Para conocer si ha habido contribución a la línea germinal, se realizan cruzamientos prueba
	Complementación de embriones tetraploides	Los PSCs se agregan con embriones tetraploides y deben ser capaces de dirigir el desarrollo completo del embrión. Los embriones 4n no son capaces de completar el desarrollo normal, pero sí contribuyen al tejido extraembrionario complementando la pluripotencialidad de las PSCs 2n

Las ESCs murinas crecen formando colonias redondeadas y compactas, con bordes bien delimitados. Las células que las integran muestran una relación núcleo-citoplasma elevada, tienen una elevada actividad de las enzimas fosfatasa alcalina y telomerasa y, al igual que las células de la ICM, presentan el antígeno embrionario específico de estadio-1 (SSEA-1). Las células expresan los factores de transcripción OCT4, NANOG y SOX2, fundamentales para el desarrollo embrionario temprano de mamíferos, y que constituyen la red esencial de regulación transcripcional de la pluripotencia (Loh *et al.*, 2006). El análisis epigenético de las mESCs ha permitido identificar la presencia de dominios bivalentes en la cromatina, en los que coexisten marcas activadoras y represoras de metilación de histonas. Esta configuración proporciona un estado de mayor plasticidad, que posibilita tanto el mantenimiento de la pluripotencia, como la capacidad de respuesta rápida a las señales pro-diferenciadoras (Gaspar-Maia *et al.*, 2011). Finalmente, cuando se inyectan en blastocistos de ratones, las mESCs contribuyen a todas las células de las tres capas germinales y a la línea germinal de animales quiméricos.

Inducción de la pluripotencia y reprogramación celular

Durante décadas se consideró que, de acuerdo con el modelo propuesto por Conrad Waddington a finales de los años 50, las vías que dirigían la progresión del desarrollo y la diferenciación celular eran unidireccionales, y el destino de las células, comprometidas hacia un linaje determinado, permanente e irreversible (Takahashi y Yamanaka, 2016). Sin embargo, en la actualidad se sabe que el estado diferenciado de una célula somática puede ser revertido a un estado pluripotente, mediante el proceso denominado **reprogramación**, abriendo la posibilidad de desarrollar estrategias de inducción de la pluripotencia por manipulación experimental (**Fig. 2**).

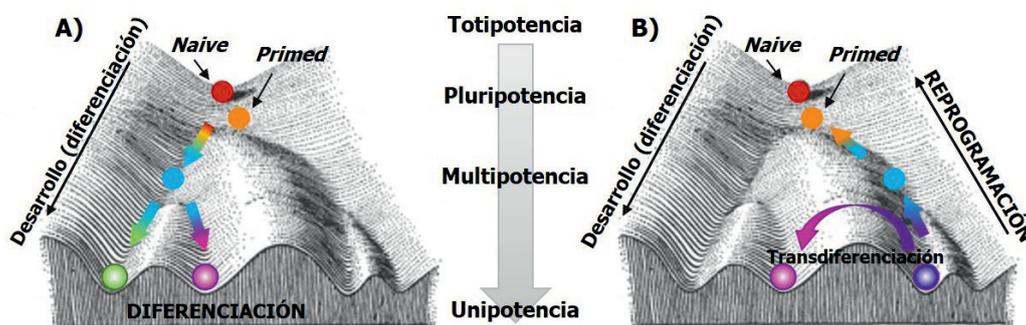


Figura 2. **A)** Proceso de desarrollo según el modelo del paisaje epigenético de Waddington. **B)** Ruta alternativa de inducción de la pluripotencia: reprogramación celular. Adaptado de Takahashi y Yamanaka, 2016.

La primera de estas estrategias se basó en poner en contacto el núcleo de la célula somática con el ambiente de un ovocito previamente enucleado. En los experimentos pioneros de **transferencia nuclear**, realizados en anfibios en los años cincuenta, se consiguió obtener organismos adultos genéticamente idénticos a las células donantes del núcleo, tanto de origen embrionario (en el caso de los trabajos de Briggs y King, 1952), como de células diferenciadas (Gurdon, 1962). En mamíferos, la aplicación de la tecnología de transferencia nuclear tuvo sus primeros frutos en la década de los ochenta, con los experimentos de MacGrath y Solter en ratón, y de Willadsen en rumiantes (revisado por Wilmut *et al.*, 2015), pero no fue hasta finales de los años noventa, cuando las investigaciones realizadas en el Instituto Roslin (Edimburgo, Reino Unido) permitieron obtener mamíferos clonados mediante transferencia nuclear, tanto a partir de células embrionarias mantenidas en cultivo (1996), como fibroblastos fetales y, finalmente, de células altamente diferenciadas de una oveja adulta, en el caso de la oveja Dolly (Wilmut *et al.*, 1997).

Estas investigaciones indicaron que la diferenciación celular y las “restricciones” epigenéticas impuestas en el genoma de la célula somática durante el

desarrollo no eran irreversibles (Hochedlinger y Jaenisch, 2015), demostrando que el ovocito contiene los factores necesarios para reprogramar el epigenoma, y sugiriendo que estos factores podrían ser identificados y utilizados en células somáticas. La existencia en las células troncales de factores transactivadores capaces de conferir el estado pluripotente a células somáticas se corroboró en ensayos de **fusión de células somáticas con PSCs** (revisado por Yamanaka y Blau, 2010), observándose que en el híbrido resultante de la fusión, o heterocarionte, se activan genes silenciados en la célula somática, que adquiere las características de la célula pluripotente.

Estos y otros estudios condujeron a la demostración de que la expresión ectópica transitoria de un conjunto mínimo de factores de transcripción asociados a células troncales embrionarias permite inducir la **reprogramación celular** de células somáticas murinas y humanas, dando lugar a la generación de células pluripotentes (Takahashi y Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). Estas células, denominadas células troncales pluripotentes inducidas o **iPSCs**, presentan características moleculares y funcionales similares a las ESCs. El “cóctel” de factores de reprogramación consiste en cuatro factores de transcripción pertenecientes a la red de regulación transcripcional de la pluripotencia: OCT3/4, SOX2, KLF4 y c-MYC (a los que nos referiremos de aquí en adelante como OSKM).

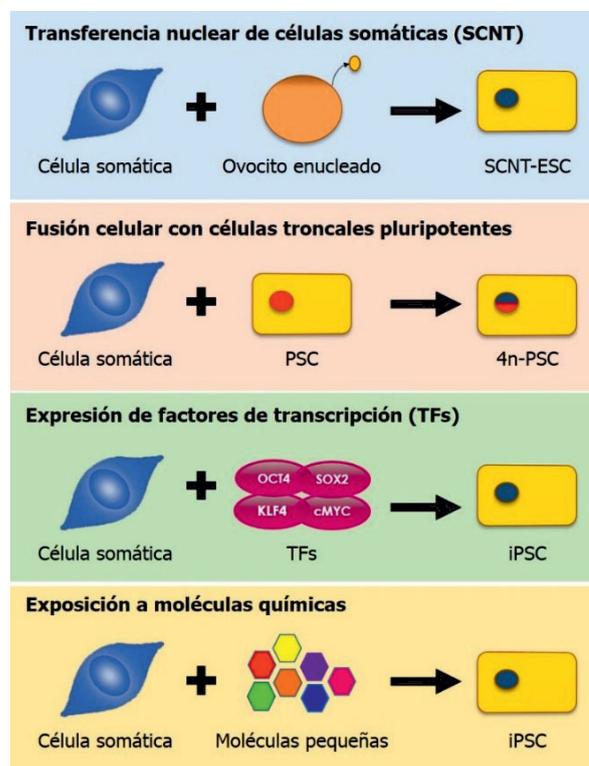


Figura 3. Diferentes estrategias para conseguir la inducción de la pluripotencia. Adaptado de Takahashi y Yamanaka, 2015.

A pesar de la mejora de las metodologías de obtención de iPSCs, la reprogramación celular es un proceso muy lento e ineficiente, y solo un número pequeño de células alcanza la reprogramación completa con éxito (menor al 0,01-0,06% en la mayoría de los casos). En los últimos años, se han desarrollado diversas estrategias para incrementar la eficiencia del proceso, al tiempo que se ha intentado evitar tanto el uso de DNA viral, como la integración permanente en el genoma de los transgenes OSKM (Rony *et al.*, 2015). Esto es debido a la posibilidad de mutagénesis insercional, así como al riesgo que conlleva la reactivación de los transgenes, que podría dar lugar a la formación de tumores. Una de las alternativas es la utilización de compuestos químicos que mejoran la eficiencia del proceso (por ejemplo, modificadores epigenéticos) o que sustituyen algunos/todos los factores OSKM (Higuchi *et al.*, 2015). Esta estrategia de reprogramación, conocida como **reprogramación química** es el foco de numerosas investigaciones encaminadas a la obtención de iPSCs clínicamente más seguras.

Fases del proceso de reprogramación

La secuencia de eventos que se inicia con el silenciamiento del programa genético de las células somáticas diferenciadas ha sido ampliamente estudiada en el caso de la reprogramación de fibroblastos (Brambrink *et al.*, 2008), y comienza a ser caracterizada en otros tipos celulares (Nefzger *et al.*, 2017). La realización de un extenso perfil transcriptómico de estas células (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010), permitió describir la reprogramación celular como un proceso secuencial, definido por tres fases: iniciación, maduración y estabilización. Complementando estos estudios, otros análisis genómicos y proteómicos han determinado que este proceso está caracterizado por dos “oleadas” de cambios moleculares, la primera estocástica y la segunda jerárquica y organizada, separadas por un periodo intermedio en el que se pueden encontrar células en un estado de reprogramación parcial (Buganim *et al.*, 2012).

La **fase de iniciación** comienza con la expresión de los factores de reprogramación OSKM en las células somáticas. Uno de los primeros cambios que se detectan es un aumento de la proliferación celular, así como un cambio en el metabolismo energético de las células, que empiezan a realizar glucólisis anaeróbica en detrimento de la fosforilación oxidativa. A nivel morfológico, tiene lugar una transformación coordinada para una reducción rápida del tamaño celular y el comienzo de la formación de grupos celulares compactos. Esto implica la pérdida de la identidad mesenquimal, seguida de la reactivación de las características epiteliales (como son el establecimiento de los contactos célula-célula, la polaridad celular y la expresión de moléculas de adhesión celular), en un pro-

ceso que recapitula la **Transición Mesénquima-Epitelio** o **MET** (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010). La transición MET, marca distintiva de la fase de iniciación, es dependiente de la vía de señalización de BMP (en acción sinérgica con los factores OSKM), y es totalmente imprescindible para que las células continúen hacia la fase de maduración.

La denominada **fase de maduración**, es un paso en “cuello de botella” que refleja la baja eficiencia del proceso de reprogramación. En esta fase desaparece por completo la expresión de los marcadores mesenquimales y se silencian los transgenes OSKM, al tiempo que se activa gradualmente la expresión de los genes endógenos asociados a la pluripotencia. Especialmente, la expresión sostenida de NANOG es necesaria para la completa maduración de las iPSCs y para que las células progresen hacia la **fase final de estabilización**, en la que tiene lugar la restauración completa de la red de regulación de la pluripotencia, con independencia de la expresión de los transgenes OSKM (Silva *et al.*, 2009). En esta fase, los cambios epigenéticos continúan, y se produce la reactivación de la telomerasa y la reactivación del cromosoma X inactivo, en células murinas con dotación cromosómica XX (Stadtfeld *et al.*, 2008).

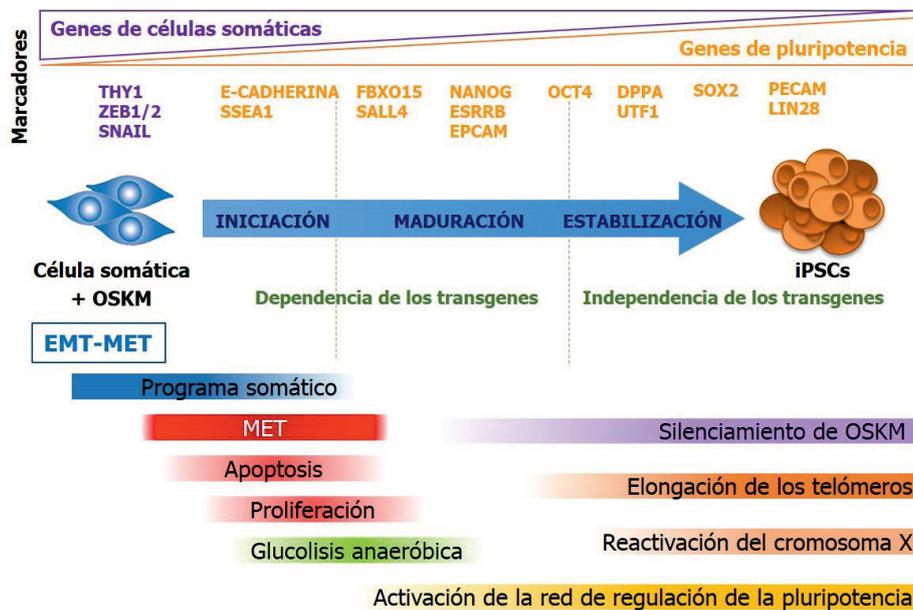


Figura 4. Fases del proceso de reprogramación y eventos moleculares secuenciales característicos (Martín-López, Tesis Doctoral, 2017).

Facilitadores y barreras moleculares de la reprogramación

A pesar de la mejora de las metodologías de obtención de iPSCs, es necesario tener en cuenta que la mayoría de las células que expresan los factores OSKM fracasan en superar las barreras epigenéticas y transcripcionales que pre-

vienen la inducción de la pluripotencia. Por ejemplo, durante la fase de iniciación, las células deben superar los procesos de parada del ciclo celular, apoptosis y senescencia, que se activan en respuesta al daño en el DNA (Marion *et al.*, 2009). Es por ello que los genes que regulan todos estos procesos celulares, como los supresores tumorales, *p16INK4a*, *Rb1* (Retinoblastoma) o *Trp53*, representan algunas de las barreras más importantes para la reprogramación y, en consonancia, la represión/inactivación de estos genes incrementa la eficiencia del proceso (Popowski y Tucker, 2015).

La familia génica de p53 está formada por los factores de transcripción p53, p73 y p63. Los tres miembros comparten una gran homología estructural y presentan varias isoformas proteicas, implicadas en la regulación de múltiples procesos biológicos (Pflaum *et al.*, 2014). p53 posee un papel central en el mantenimiento de la integridad genómica, regulando el ciclo celular, la senescencia y apoptosis. Tanto p63 como p73 pueden activar la transcripción de genes diana de p53, pero también son capaces de regular vías de señalización independientes y de desempeñar funciones específicas propias. Diferentes grupos de investigación han demostrado que la falta de p53 incrementa la cinética y eficiencia del proceso de reprogramación (Hong *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2009). Por el contrario, p63 (la isoforma DNp63) actúa como un regulador positivo de la reprogramación. En el caso de p73, Martin-Lopez *et al.* (2017) han demostrado que p73 es necesario para que el proceso de reprogramación se produzca de forma eficiente, incluso en ausencia de p53. En concreto, la función de p73 es necesaria para que se lleve a cabo adecuadamente la transición MET durante la fase de iniciación. Estos autores han propuesto un modelo en el cual la expresión de p73 se induce durante el proceso de reprogramación celular para modular positivamente la vía de señalización de BMP durante la transición MET. De acuerdo con ese modelo, la isoforma DNp73 incrementaría la señalización de BMP mediante la represión directa del inhibidor de la vía, Smad6. Por tanto, p73 se comportaría como un regulador positivo de la reprogramación celular (Martin-Lopez *et al.*, 2017).

Consideraciones finales

Desde la obtención de las primeras líneas de iPSCs hace algo más de una década, estas células se han convertido en una herramienta muy relevante para la investigación biomédica (Shi *et al.*, 2016). En primer lugar, la posibilidad de obtener células pluripotentes a partir de una gran diversidad de células somáticas, junto con la capacidad de diferenciación de las iPSCs a cualquier tipo celular del organismo, ha revolucionado el campo de la terapia celular, al permitir dispo-

ner de una valiosa fuente de células y evitando tanto los problemas éticos suscitados por la derivación de ESCs humanas, como la posibilidad de rechazo inmunológico por parte del paciente. Por este motivo, gran parte de esfuerzos han estado encaminados a generar iPSCs clínicamente útiles y seguras y, actualmente, existen varios ensayos en fase clínica con iPSCs humanas (Ilic *et al.*, 2015; Guhr *et al.*, 2018).

Por otro lado, también se han realizado numerosas investigaciones reprogramando células somáticas procedentes de pacientes con patologías, con el fin de modelar estas enfermedades *in vitro* (Warren y Cowan, 2017; Karagiannis *et al.*, 2019). Esto no sólo permite estudiar de forma detallada los mecanismos moleculares involucrados en la patogenia de la enfermedad, sino que facilita el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos.

Finalmente, la combinación de la reprogramación celular con la tecnología de edición génica ofrece oportunidades sin precedentes tanto para la generación de modelos más precisos de enfermedades, como para la corrección de las mutaciones en células derivadas de pacientes, las cuales podrían ser reprogramadas y utilizadas para las aplicaciones ya mencionadas (Raya *et al.*, 2009; Hockemeyer y Jaenisch, 2016). La futura traslación a la clínica de estas tecnologías no sólo requerirá avances técnicos y la mejora del conocimiento de la biología de las células troncales, sino que las importantes implicaciones éticas asociadas deberán ser debatidas por la comunidad científica y apropiadamente reguladas.

Bibliografía

- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H. y Jaenisch, R. 2008. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2: 151-159.
- Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M. *et al.* 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448: 191-195.
- Buganim, Y., Faddah, D.A., Cheng, A.W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K. *et al.* 2012. Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* 150: 1209-1222.
- Du, P., Pirouz, M., Choi, J., Huebner, A.J., Clement, K., Meissner, A. *et al.* 2018. An intermediate pluripotent state controlled by microRNAs is required for the naive-to-primed stem cell transition. *Cell Stem Cell* 22: 851-864.
- Evans, M.J. y Kaufman, M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential

- cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
- Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E. y Ramalho-Santos, M. 2011. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12: 36-47.
- Higuchi, A., Ling, Q.D., Kumar, S.S., Munusamy, M.A., Alarfaj, A.A., Chang, Y., *et al.* 2015. Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. *Laboratory Investigation* 95: 26-42.
- Hochedlinger, K. y Jaenisch R. 2015. Induced pluripotency and epigenetic reprogramming. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: pii: a019448.
- Hockemeyer, D. y Jaenisch, R. 2016. Induced pluripotent stem cells meet genome editing.
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M. *et al.* 2009. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460: 1132-1135.
- Ilic, D., Devito, L., Miere, C. y Codognotto, S. 2015. Human embryonic and induced pluripotent stem cells in clinical trials. *British Medical Bulletin* 116: 19-27.
- Kalkan, T. y Smith, A. 2014. Mapping the route from naive pluripotency to lineage specification. *Philosophical Transactions of The Royal Society Of London Series B, Biological sciences* 369.
- Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A. *et al.* 2019. Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development. *Physiological Reviews* 99: 79-114.
- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y.V., Menendez, S., Morera, L.B., Raya, A., *et al.* 2009. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460: 1140-1144.
- Klimczewska K., Kaspercuk A. y Suwinska A. 2018. The regulative nature of mammalian embryos. *Current topics in Developmental Biology* 128: 105-149.
- Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H. *et al.* 2010. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7: 51-63.
- Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., *et al.* 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics* 38: 431-440.
- Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S *et al.* 2009. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure

- iPS cell genomic integrity. *Nature* 460: 1149-1153.
- Martin-Lopez, M., Maeso-Alonso, L., Fuertes-Alvarez, S., Balboa, D., Rodríguez-Cortez, V., Weltner, J., *et al.* 2017. p73 is required for appropriate BMP-induced mesenchymal-to-epithelial transition during somatic cell reprogramming. *Cell Death & Disease* 8: e3034.
- Matsui, Y., Zsebo, K. y Hogan, B.L. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70: 841-847.
- Nefzger, C.M., Rossello, F.J., Chen, J., Liu, X., Knaupp, A.S., Firas, J. *et al.* 2017. Cell type of origin dictates the route to pluripotency. *Cell Reports* 21: 2649-2660.
- Pflaum, J., Schlosser, S. y Müller, M. 2014. p53 family and cellular stress responses in cancer. *Frontiers in Oncology* 4: 285.
- Popowski, M. y Tucker, H. 2015. Repressors of reprogramming. *World Journal of Stem Cells* 7: 541-546.
- Raya, A., Rodríguez-Piza, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M.J. *et al.* 2009. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460: 53-59.
- Rezza, A., Sennett, R. y Rendl, M. 2014. Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Current Topics in Developmental Biology* 107: 333-372.
- Rony, I.K., Baten, A., Bloomfield, J.A., Islam, M.E., Billah, M.M. y Islam, K.D. 2015. Inducing pluripotency in vitro: recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell Proliferation* 48: 140-156.
- Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H.K., Beyer, T.A., Datti, A., *et al.* 2010. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 7: 64-77.
- Seah M.K.Y. y Messerschmidt D.M. From germline to soma: epigenetic dynamics in the mouse preimplantation embryo. 2018. *Current topics in Developmental Biology* 128: 203-235.
- Shi, Y., Inoue H., Wu, J.C. y Yamanaka S. 2017. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery* 16: 115-130.
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T.W., Guo, G., van Oosten, A.L., Barrandon, O., *et al.* 2009. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138: 722-737.
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T. y Hochedlinger, K. 2008. Defining

- molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2: 230-240.
- Warren, C.R. y Cowan, C.A. 2018. Humanity in a dish: population genetics with iPSCs. *Trends in Cell Biology* 28: 46-57.
- Wu, J. y Izpisua Belmonte, J.C. 2015. Dynamic Pluripotent Stem Cell States and Their Applications. *Cell Stem Cell* 2015 17: 509-525.
- Takahashi S, Kobayashi S, Hiratani I. 2018. Epigenetic differences between naive and primed pluripotent stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75: 1191-1203.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M, Narita, M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-72.
- Takahashi, K. y Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
- Takahashi, K. y Yamanaka S. 2016. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17: 183-193.
- Weinberger L, Ayyash M, Novershtern N, Hanna JH. 2016. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17: 155-169.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. y Campbell, K.H.S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
- Wilmut, I., Bai, y. y Taylor, J. 2015. Somatic cell nuclear transfer: origins, the present position and future opportunities. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 370: 20140366.
- Yamanaka, S. y Blau, H.M. 2010. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465: 704-712.