



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS A  
DERIVADOS DE LA CRESTA NEURAL POR ACTIVACIÓN  
REGULADA DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES**

# **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**KARLA MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ MALDONADO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.  
DR. JESÚS CHIMAL MONROY  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.**

**MÉXICO, CD. MX. ENERO, 2019.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS A  
DERIVADOS DE LA CRESTA NEURAL POR ACTIVACIÓN  
REGULADA DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES**

# **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**KARLA MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ MALDONADO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.  
DR. JESÚS CHIMAL MONROY  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.**

**MÉXICO, CD. MX. ENERO, 2019.**



OFICIO CPCB/048/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

**M. EN C. IVONNE RAMÍREZ WENCE**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria del día 26 de noviembre de 2018, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna, **MÉNDEZ MALDONADO KARLA MARÍA DEL CARMEN** con número de cuenta **414103569** con la tesis "Diferenciación de células troncales embrionarias a derivados de la cresta neural por activación regulada de factores transcripcionales", realizada bajo la dirección de la **DR. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ**:

Presidente: DR. JULIO MORÁN ANDRADE  
Vocal: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO  
Secretario: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO  
Suplente: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES  
Suplente: DRA. MÓNICA LAMAS GREGORI

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de enero de 2019

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

1.- Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado.

2.- Al CONACYT y a Papiit, por otorgarme una beca durante los estudios de doctorado con número de CVU 384784 y IN213716, respectivamente.

Al CONACYT por los apoyos económicos otorgados a los proyectos con número: 131281 y 256092

A la Red Temática de Células Troncales y Medicina Regenerativa y a la Dirección de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Papiit) por los apoyos otorgados a los proyectos IN208713/IN213716.

3.- Agradezco al Dr. Iván Velasco Velázquez por aceptarme en su equipo de trabajo, por darme la oportunidad de trabajar con las células troncales, por sus consejos y por la dirección para realizar este trabajo de investigación.

Agradezco a la Dra. Rosana Pelayo y al Dr. Jesús Chimal, por aceptar ser parte de mi comité tutor, por las observaciones, correcciones y consejos durante mis estudios de posgrado.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Agradezco a Dios por permitirme terminar mis estudios de posgrado.

Agradezco a mi Mamá y a mi Papá por su apoyo durante toda mi formación académica. Por su amor incondicional, por su comprensión cuando no pude estar con ellos por estar trabajando en el laboratorio o en la casa. A ustedes les digo, gracias por guiarme y enseñarme que lo que yo me propusiera lo podía lograr.

Agradezco a Alex, mi esposo, por su amor, su apoyo incondicional, por su comprensión y complicidad cuando tuve que quedarme trabajando hasta la madrugada, por ayudarme cuando lo necesité, por sus consejos para realizar mi trabajo cuando me veía frustrada, por hacerme reír cuando más estresada estaba, por donarme reactivos jiji, por su paciencia, por sus palabras de aliento y principalmente por estar a mi lado y hacer que esta vida esté llena de dicha y felicidad. Te amo Alex

A mis hermanos y sobrinos, por su amor, por sus risas, por su apoyo incondicional y por comprender cuando no estuve con ellos.

A mi familia por su apoyo, por estar al pendiente de mí para saber cómo iba en el posgrado y por su comprensión cuando no pude convivir con ellos.

A Fernanda Vargas por ser mi amiga y cómplice cuando comencé el doctorado, por seguir presente a pesar de que estés en Arabia.

A mis compañeros del Lab AI-101, a la Dra. Itzel Escobedo y a Daniel por conseguir los reactivos lo más rápido posible y por su asesoría técnica. A Andrea T., Vicente, César, Rolando, Karla Itzel, Oscar, Beetsi, Xóchitl, Alonso, Fernando y Ángel por sus risas, por todos los momentos que pasamos en el lab., en reuniones y por su ayuda cuando la necesite.



## **DEDICATORIA**

A Alejandro con todo mi amor, por su apoyo y su amor.

A mi Mamá, por darme la vida, por su amor y por ser mi ejemplo para ser la mujer que soy.

A mi Papá por su amor y por sus enseñanzas.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<i>i</i>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<i>Células troncales</i> .....	<b>7</b>
<i>Cresta Neural</i> .....	<b>9</b>
<i>Inducción de la cresta neural</i> .....	<b>10</b>
<i>Hes1 y su función en el desarrollo de la CN</i> .....	<b>11</b>
<i>Regulación de la expresión Hes1</i> .....	<b>13</b>
<i>Msx1 y su función en el desarrollo de la CN</i> .....	<b>14</b>
<i>Regulación de la expresión Msx1</i> .....	<b>16</b>
Receptor a glucocorticoides humano como sistema inducible .....	<b>18</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>19</b>
Objetivos particulares: .....	<b>19</b>
<b>5. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>20</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
<b>Cultivo celular</b> .....	<b>20</b>
Fibroblastos embrionarios de ratón NIH-3T3.....	<b>20</b>
Células troncales embrionarias de ratón .....	<b>21</b>
Células estromales con actividad inductora (células PA6) .....	<b>21</b>
<b>Diseño y construcción de los transgenes</b> .....	<b>21</b>
<b>Evaluación de la funcionalidad del sistema inducible</b> .....	<b>22</b>
<b>Generación de líneas de CTE de ratón transgénicas</b> .....	<b>23</b>
<b>Análisis de la inserción de los transgenes</b> .....	<b>24</b>
<b>Inducción de diferenciación de CTE a CCN</b> .....	<b>24</b>

<b>Extracción de RNA y síntesis de cDNA .....</b>	<b>26</b>
<b>Amplificación génica .....</b>	<b>26</b>
<i>RT-PCR punto final</i> .....	26
<i>RT-PCR cuantitativo</i> .....	27
<b>Inmunotinción.....</b>	<b>27</b>
<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>28</b>
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
<b>7.1 Expresión de Hes1 y Msx1 en CTE tipo <i>silvestre</i> en condiciones pluripotentes y diferenciadas hacia CN .....</b>	<b>29</b>
<b>7.2 Construcción de plásmidos e inducción de la localización nuclear .....</b>	<b>31</b>
<b>7.3 Obtención de CTE transgénicas con GR, HGR, MGR o HGR+MGR.....</b>	<b>33</b>
<b>7.4 Análisis de la incorporación de los transgenes en las clonas resistentes. ....</b>	<b>34</b>
<b>7.5 La expresión del receptor a glucocorticoides humano, Hes1 y Msx1 son similares en las células transgénicas antes de la diferenciación. ....</b>	<b>38</b>
<b>7.6 Expresión de marcadores neurales y de cresta neural en las CTE antes y después de la diferenciación.....</b>	<b>40</b>
<b>7.7 La activación de HES1 y MSX1 incrementó las células positivas a <math>\beta</math>-TUBULINA III y <math>\alpha</math>-SMA.....</b>	<b>45</b>
<b>7.8 Las células MGR y dobles transgénicas incrementaron la diferenciación a condrocitos. ....</b>	<b>48</b>
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
<b>9. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO 1: TABLAS.....</b>	<b>73</b>
<b>Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para amplificar el cDNA de Hes1 y Msx1.....</b>	<b>74</b>
<b>Tabla 2. Plásmidos obtenidos con los transgenes de Hes1 y Msx1.....</b>	<b>75</b>
<b>Tabla 3.- Secuencia de oligonucleótidos para el análisis de las clonas que incorporaron los transgenes Hes1 y/o Msx1.....</b>	<b>76</b>
<b>Tabla 4.- Secuencias de oligonucleótidos para PCR punto final .....</b>	<b>77</b>
<b>Tabla 5.- Secuencias de oligonucleótidos para PCR tiempo real. ....</b>	<b>78</b>
<b>Tabla 6. Anticuerpos primarios para la detección de proteínas específicas. ....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO 2: ARTÍCULO REQUISITO.....</b>	<b>80</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1** Células troncales embrionarias.
- Figura 2** Células de la cresta neural y sus derivados
- Figura 3** Estructura proteínica del factor transcripcional HES1 de ratón
- Figura 4** Regulación de la transcripción de *Hes1*.
- Figura 5** Estructura proteínica del factor transcripcional MSX1.
- Figura 6** Regulación de la transcripción de *Msx1*.
- Figura 7** Diferenciación de células pluripotentes a derivados de la cresta neural y cultivo en micromasas.
- Figura 8.** Expresión de *Hes1* y *Msx1* en condiciones pluripotentes y en células diferenciadas a CN.
- Figura 9** Generación de células troncales embrionarias de ratón transgénicas que expresan *Hes1* y *Msx1*.
- Figura 10** Expresión e inducción de la translocación nuclear de los transgenes.
- Figura 11.** Obtención y análisis de CTE de ratón que incorporaron a *Hes1* y/o *Msx1*.
- Figura 12** Las CTE de ratón expresaron los marcadores de pluripotencia.
- Figura 13** Las CTE transgénicas se mantuvieron pluripotentes.
- Figura 14.** RT-PCR para detectar el transgen del receptor a glucocorticoides humano y los niveles endógenos de *Hes1* y *Msx1* en células pluripotentes silvestres y líneas transgénicas.
- Figura 15** Inducción de marcadores de cresta neural en células diferenciadas, en condiciones control.
- Figura 16** La activación de la translocación nuclear de las proteínas quiméricas durante la diferenciación de las CTE en derivados de la CN incrementó los transcritos de *Col2a1* en células MGR (*Msx1*-GR) y  $\alpha$ -*Sma* en las células dobles-transgénicas.
- Figura 17** Activación de HGR (*Hes1*-GR) y MGR (*Msx1*-GR) con Dex en las células dobles transgénicas incrementó la diferenciación de células positivas para  $\beta$ -TUBULINA III y  $\alpha$ -SMA.

- Figura 18** La activación de la translocación nuclear de HGR y MGR en las células doble transgénicas incrementó el número de células diferenciadas COL2A1<sup>+</sup>.
- Figura 19** Activación de MSX1 incrementó la proporción de células positivas a Azul alciano de cultivos en micromasas.
- Figura 20** Esquema de la participación de HES1 y MSX1 en la diferenciación de CTE de ratón hacia derivados de la CN

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
bHLH	Estructura de Hélice-bucle-hélice básico (por sus siglas en inglés “basic Helix-loop-helix”)
BMP’s	Proteínas morfogénicas de hueso (del inglés “bone morphogenic proteins”)
CCN	Células de la cresta neural
CT	Células troncales
CTE	Células Troncales Embrionarias
CN	Cresta Neural
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (del inglés “complementary deoxyribonucleic acid”)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés “deoxyribonucleic acid”)
Dex	Dexametasona
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares (del inglés “Extracellular-signal-regulated kinase”)
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GR	Receptor a glucocorticoides humano
GSK-3 $\beta$	Glucógeno sintasa cinasa isoforma 3 $\beta$ (del inglés “Glycogen synthase kinase-3 beta”)

Hes1	Factor de transcripción homólogo del gen Hairy de <i>Drosophila</i> (por sus siglas en inglés “Hairy and enhancer of split 1”)
HGR	Proteína quimérica Hes1 con GR
Msx1	Factor de transcripción homólogo del gen Msh homeótico de <i>Drosophila</i> (por sus siglas en inglés “ muscle segment homeobox 1”)
MGR	Proteína quimérica Msx1 con GR
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos (del inglés “phosphate buffered saline”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “polymerase chain reaction”)
PFA	para-formaldehído
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero (del inglés “messenger Ribonucleic acid”)
Shh	Sonic hedgehog
$\alpha$ -SMA	Actina de músculo liso isoforma alfa (del inglés “ $\alpha$ -smooth muscle actin”)
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante isoforma beta (del inglés “transforming growth factor $\beta$ ”)

## RESUMEN

La cresta neural (CN) comprende una población de células multipotentes que da origen a neuronas periféricas, cartílago y células de músculo liso, entre otros tipos celulares. La participación de Hes1 y Msx1 cuando se expresan en células troncales embrionarias de ratón (CTE) que se diferencian a CN no se ha estudiado. En este trabajo, generamos CTE de ratón que expresan de forma estable las proteínas quiméricas de Hes1, Msx1 o Hes1+Msx1. Las proteínas quiméricas están constituidas por la región codificante de Hes-1 o Msx-1 y por el dominio de unión al ligando del receptor a glucocorticoides humano (GR), generando las proteínas quiméricas Hes1-GR (HGR) o Msx1-GR (MGR). Las líneas transgénicas continuaron expresando marcadores de pluripotencia. Tras la diferenciación a CN, todas las líneas mostraron una expresión de Sox2 significativamente reducida y un incremento en la expresión de Sox9, Snai1 y Msx1, lo que indica un compromiso CN. Para inducir la translocación nuclear de las proteínas quiméricas, se agregó Dex. Encontramos que los transcritos de *Colágena Ila* aumentaron en las células MGR, mientras que la coactivación de HGR+MGR provocó un aumento significativo en los transcritos de actina del músculo liso ( $\alpha$ -Sma). La inmunotinción mostró que la activación en las células HGR + MGR indujo mayores proporciones de las células  $\beta$ -TUBULINA III+,  $\alpha$ -SMA+ y COL2A1+. Estos resultados indican que la translocación nuclear de MSX-1, sola o en combinación con HES-1, produce células similares a condrocitos, y la activación simultánea de HES-1 y MSX-1 incrementa la generación de células de músculo liso y neuronas.



## ABSTRACT

The neural crest (NC) comprises a multipotent cell population that produces peripheral neurons, cartilage, and smooth muscle cells, among other phenotypes. The participation of Hes1 and Msx1 when expressed in mouse embryonic stem cells (mESCs) undergoing NC differentiation is unexplored. In this work, we generated stable mESCs transfected with constructs encoding chimeric proteins in which the ligand binding domain of glucocorticoid receptor (GR), which is translocated to the nucleus by dexamethasone addition, is fused to either Hes1 (HGR) or Msx1 (MGR), as well as double-transgenic cells (HGR+MGR). These lines continued to express pluripotency markers. Upon NC differentiation, all lines exhibited significantly decreased Sox2 expression and upregulated Sox9, Snai1, and Msx1 expression, indicating NC commitment. Dexamethasone was added to induce nuclear translocation of the chimeric proteins. We found that Collagen IIa transcripts were increased in MGR cells, whereas coactivation of HGR+MGR caused a significant increase in Smooth muscle actin ( $\alpha$ -Sma) transcripts. Immunostaining showed that activation in HGR+MGR cells induced higher proportions of  $\beta$ -TUBULIN III+,  $\alpha$ -SMA+ and COL2A1+ cells. These findings indicate that nuclear translocation of MSX-1, alone or in combination with HES-1, produce chondrocyte-like cells, and simultaneous activation of HES-1 and MSX-1 increases the generation of smooth muscle and neuronal cells.

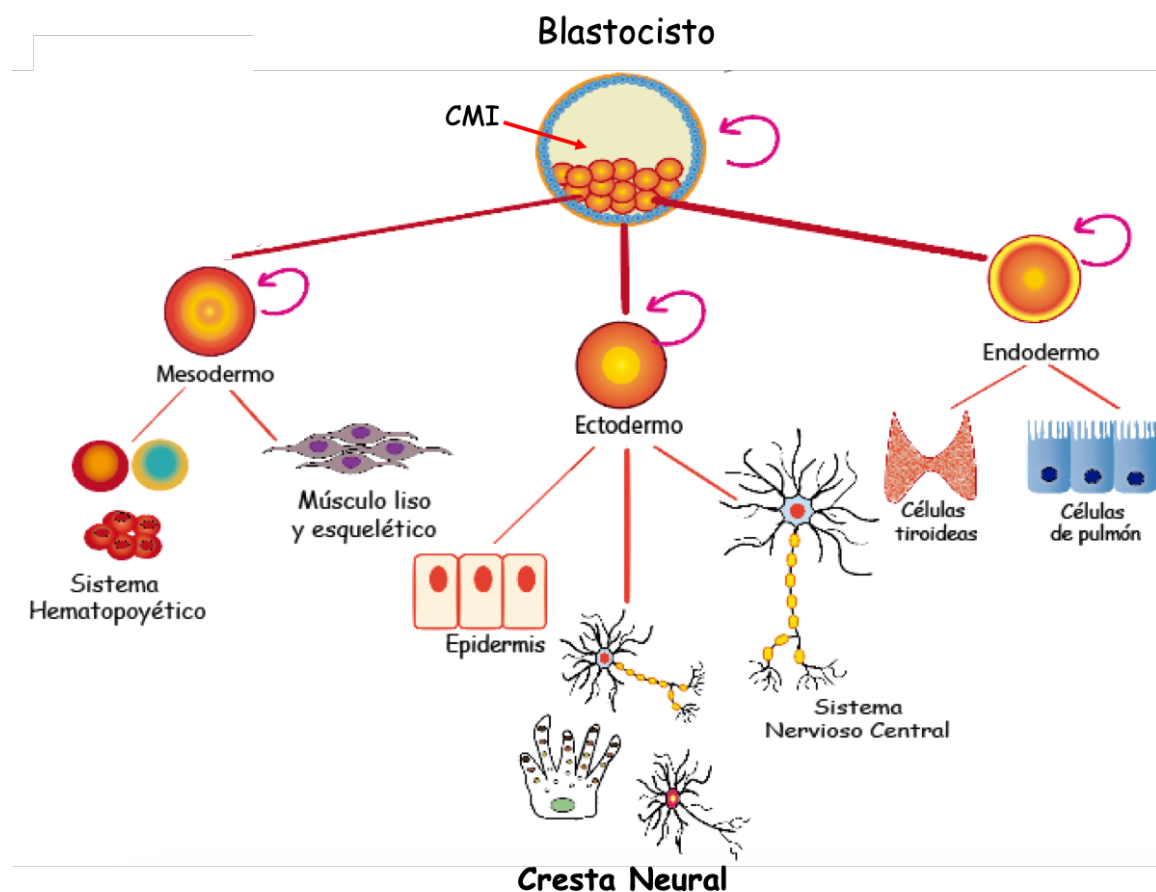
# 1. INTRODUCCIÓN

## ***Células troncales***

Las células troncales (CT) se definen funcionalmente como células que se auto-renuevan en estado indiferenciado y que poseen la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares. Se pueden clasificar de acuerdo con su capacidad de generar distintos linajes celulares y se le denomina potencialidad. Con base en lo anterior, las CT se dividen en: *pluripotenciales*, *multipotenciales* y *unipotenciales*. Las CT pluripotentes se obtienen de la masa celular interna del blastocisto y pueden diferenciarse *in vitro* a linajes que pertenecen a las tres capas germinales embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo <sup>1</sup>. **(Figura 1)**

Ejemplos de las CT con características de pluripotencia son: células de carcinoma embrionario, células troncales embrionarias (CTE), células germinales embrionarias, células del epiblasto y las CT pluripotenciales inducidas <sup>1</sup>. Con respecto a las CTE de ratón, éstas se mantienen en estado no diferenciado en presencia del factor LIF (del inglés, Leukemia Inhibitory Factor), o bien al mantenerse en crecimiento sobre una capa de fibroblastos embrionarios mitóticamente inactivos. Por otro lado, Smith y cols. demostraron que la inhibición de dos vías de señalización, la vía de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, por sus siglas en inglés “Extracellular regulated kinase) utilizando el inhibidor PD0325901 [1 µM] y la vía de señalización de glucógeno sintasa cinasa isoforma 3β (“Glycogen synthase kinase-3 beta”) utilizando el inhibidor CHIR99021 [3 µM] y la adición de LIF mantienen la pluripotencia de las CTE de ratón <sup>2</sup>. La pluripotencia de las CT es primordial para generar cualquier tipo celular de las tres capas germinales. El destino de las CT, como durante el desarrollo embrionario, se define por diferentes factores transcripcionales (FT), que reprimen o activan la expresión génica. Se ha descrito que los FT que participan en el mantenimiento de la pluripotencia de las CT son: *Oct4* (regulador maestro de la pluripotencia) <sup>3</sup>, *Nanog* (mantiene la auto-renovación de las CT en ausencia de LIF) <sup>4</sup> y *Sox2* (se requiere para la formación del epiblasto y el ectodermo extraembrionario) <sup>5</sup>.

Para diferenciar a las CT a diversos tipos celulares, se demostró que el cultivo de éstas sobre una monocapa de células estromales con capacidad inductora, es capaz de generar diversos linajes celulares del sistema nervioso y cuando son tratadas con diferentes factores de crecimiento pueden generar colonias de células precursoras neurales <sup>6</sup>. Las células pluripotenciales que adquieren un compromiso específico se clasifican como *CT multipotenciales* (CTM) dando origen a determinados linajes celulares de la misma capa germinal como a las CT hematopoyéticas, CT neurales, CT mesenquimales, etc. *Las células troncales unipotentes* son capaces de diferenciarse a un linaje de sólo una capa germinal, por ejemplo, las células de las espermatogonias, que son las células troncales en el testículo que dan origen a los espermatozoides. <sup>1</sup>



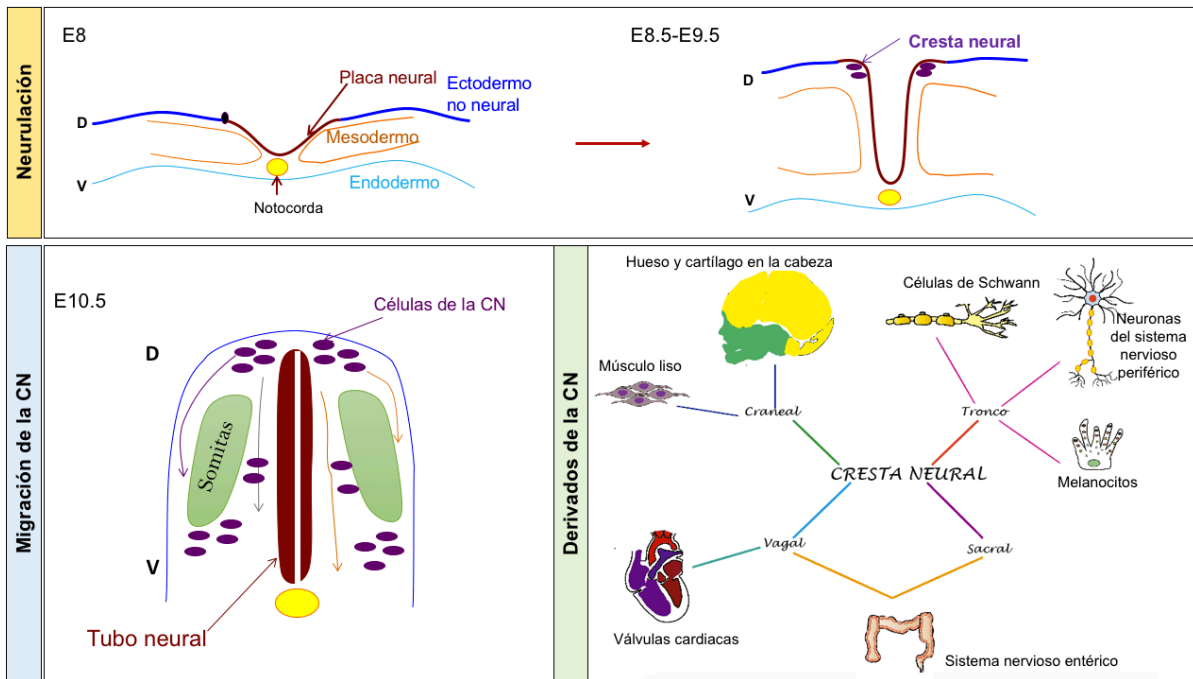
**Figura 1.- Células troncales embrionarias.** Las CTE se obtienen de la masa celular interna (MCI) del blastocisto. Las CTE, en condiciones de cultivo, son capaces de auto-renovarse y diferenciarse a las tres

capas germinales (mesodermo, endodermo y ectodermo). Las células del ectodermo pueden diferenciarse a epidermis, el SNC y a la Cresta Neural.

## ***Cresta Neural***

Las células de la cresta neural (CCN), descritas en 1868 por Wilhelm His, observó a la cresta neural como una tira de células entre el ectodermo dorsal y el tubo neural. Las CCN es una subpoblación transitoria de células multipotentes que se origina del ectodermo, es exclusiva de los vertebrados y durante el desarrollo embrionario se localiza en la parte mas dorsal del tubo neural. Esta población tiene la capacidad de migrar a diferentes sitios del organismo en desarrollo y colonizar diferentes sitios del cuerpo rápidamente.<sup>7,8</sup> La diferenciación de las CCN en los diferentes sitios blanco origina a una gran variedad de tipos celulares como células sensoriales, autonómicas, ganglios entéricos en el sistema nervioso periférico, el cartílago y huesos de la cara, melanocitos y células del músculo liso, así como otros tejidos.<sup>9-11</sup> **(Figura 1 y 2).**

En la literatura científica hay diversos trabajos sobre el origen de estas células. La inducción y la diferenciación de la CN se ha estudiado en diversos modelos animales, como en el pez cebra, *Xenopus laevis*, pollo, ratón y recientemente en humano. De manera muy general, se describió que esta población se induce por la interacción entre el ectodermo no-neural y la placa neural antes del cierre del tubo neural o durante el cierre del tubo neural, dependiendo del organismo.<sup>12,13</sup> Sin embargo, el trabajo realizado en aves demostró que, en el pollo, la especificación de la CN ocurre durante la gastrulación.<sup>14</sup> Con respecto a los mamíferos no se conoce mucho acerca de la inducción (proceso de activación de una célula no diferenciada para diferenciarse a un tipo celular) y la especificación (proceso de diferenciación de un tipo celular que puede ser reversible dependiendo de las condiciones micro-ambientales) de la CN, por lo que su estudio es de gran importancia para comprender el desarrollo de la CN y entender las enfermedades originadas en los derivados de la CN.



**Figura 2.- Células de la cresta neural y sus derivados.** En la imagen se muestra el proceso de Neurulación durante el desarrollo embrionario y a las CCN en la parte mas dorsal del tubo neural, su patrón de migración y los tipos celulares a los que se diferencia.

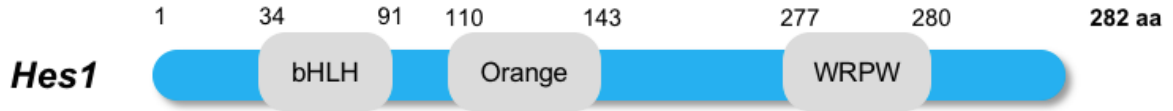
### ***Inducción de la cresta neural***

Para estudiar la diferenciación de la CN se han utilizado modelos *in vivo* e *in vitro*. En estudios *in vitro* utilizaron células pluripotenciales y se sometieron a diferentes protocolos para inducir neuronas, como la adición de ácido retinoico<sup>15</sup> o cultivarlas en medio libre de suero.<sup>16</sup> Inicialmente, se consiguió la inducción de la CN a partir de células troncales embrionarias de ratón usando la actividad inductora derivada de las células estromales (SDIA) con células PA6<sup>17</sup> y posteriormente se consiguió en CTE de humano al activar la vía de señalización Wnt<sup>18</sup> o la vía de Notch.<sup>19</sup> Se sabe que durante la inducción de la CN participan diversas vías de señalización y factores de transcripción, como las vías de señalización de BMP4, FGF, Wnt y Notch, siendo los inductores de CN en todos los organismos vertebrados<sup>20-22</sup>. Asimismo, en diversos modelos experimentales, se estudió la importancia de diferentes factores de transcripción como los de la

familia Snail (Snail y Slug)<sup>23,24</sup>, FoxD3<sup>25,26</sup>, Xmsx1<sup>27</sup>, Sox9<sup>28</sup> y Sox10,<sup>29</sup> durante la especificación inicial de la CN. A pesar de los avances recientes y de la identificación de nuevas vías de señalización involucradas en el desarrollo de la CN como la de endotelina,<sup>30</sup> aún hay aspectos que no se conocen, como la interacción y la regulación de los diferentes miembros de las vías de señalización involucradas en la inducción, diferenciación y migración de la CN especialmente en mamíferos. Además de los FT antes mencionados, el grupo del Dr. Aybar hizo estudios de la participación de Msx1 y Hairy2a en la inducción del desarrollo de la CN en *Xenopus laevis*, en donde encontraron que Msx1 participa en la inducción de la CN, Hairy2a participa en la inducción de progenitores neurales y la activación de ambos factores transcripcionales promovió la expresión de transcritos de Snail, un factor transcripcional característico de la CN en *X. laevis* y no de la CN de mamíferos.<sup>27,31</sup> Con base en estos estudios, evaluamos si la expresión simultánea de HES1 y MSX1, durante la diferenciación a CN de mamíferos, tienen alguna implicación en el número de células obtenidas después de la diferenciación y que tipo de células de la CN se obtuvieron, a partir de CTE de ratón.

### ***Hes1 y su función en el desarrollo de la CN***

Los genes Hes (Hes1-7) son homólogos de mamíferos de los genes de *Drosophila Hairy and Enhancer of Split [E(spl)]*, codifican proteínas nucleares que reprimen la transcripción de manera activa o pasiva.<sup>32</sup> Estas proteínas tienen tres dominios conservados que se encargan de la función transcripcional en todos los factores Hes: 1) El dominio bHLH que contiene el sitio de unión a DNA y la región de dimerización, 2) El dominio Orange que regula la selección del heterodímero bHLH y 3) el dominio WRPW en el C-terminal, que consiste de un tetra péptido Trp-Arg-Pro-Trp, el cual reprime la transcripción y también actúa como señal de poli-ubiquitinación para la degradación de la proteína de Hes por el proteasoma.<sup>33-35</sup> **(Figura 3)**



**Figura 3.- Estructura proteínica del factor transcripcional *Hes1* de ratón.** La proteína de HES1 contiene 3 dominios conservados bHLH (sitio de unión a DNA), Orange (regula la selección de heterodímero) y WRPW (regulación de la transcripción y degradación) y está conformado por 282 aa.

Las proteínas Hes también participan en la progresión del ciclo celular.<sup>36</sup> En particular, HES1 es esencial para la auto-renovación y la supervivencia de las células multipotentes neurales del Sistema Nervioso Central (SNC).<sup>37</sup> HES1 reprime la expresión de genes pro-neurales como la expresión de Mash1, Neurogenina-2 (Ngn2) y Math1. Las mutaciones en los genes Hes de vertebrados, demostraron que las proteínas HES son represores esenciales para el desarrollo de los neuroblastos en el SNC, observándose fenotipos sin cierre del tubo neural, anomalías en ojos, oídos y defectos craneofaciales.<sup>38</sup> Con base en lo anteriormente descrito, en el 2006 evaluaron la participación de los genes Hes en la diferenciación de células que no provenían del tubo neural, específicamente en las células de la cresta neural. Kageyama y cols. generaron ratones Knock-Out (KO) para *Hes1* y *Hes5*, en donde analizaron el efecto en el desarrollo del sistema nervioso periférico (SNP). El SNP se origina de la cresta neural y está conformado por los nervios craneales y los nervios de la médula espinal. Mediante inmunotinciones e hibridaciones *in situ*, evaluaron la formación de neurofilamentos, característicos del SNP y observaron que la ausencia de estos dos genes provocó una severa desorganización en el sistema nervioso craneal y espinal, lo cual indicó que HES1 y HES5 participan de forma muy importante en el desarrollo del SNP.<sup>39</sup> Otros estudios en 2010 evaluaron la participación de *Hes1* en la morfología craneofacial en ratón. En este estudio usaron ratones nulos para *Hes1* y observaron que la ausencia de este represor alteró el desarrollo de estructuras derivadas de la

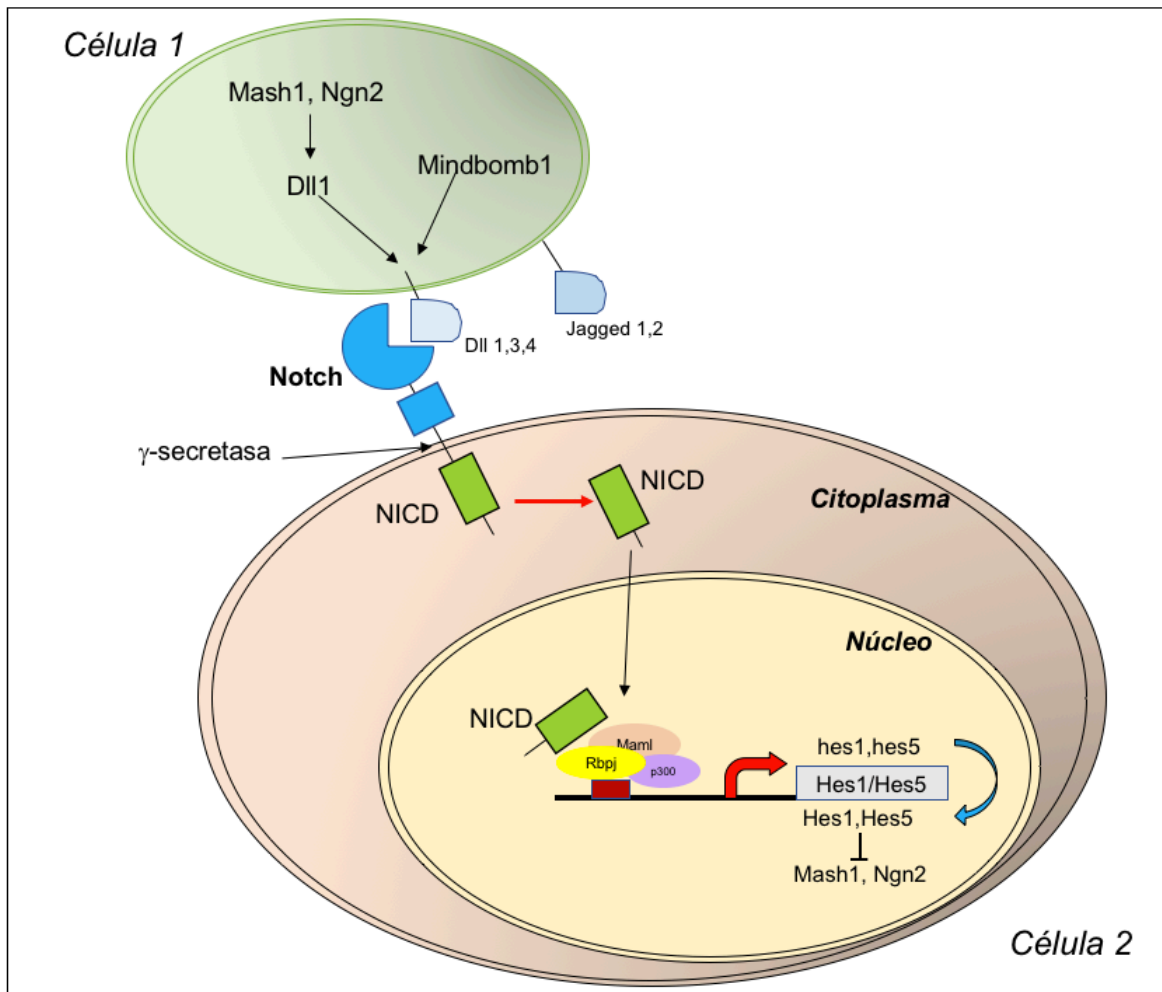
CN craneal, como la formación del cartílago nasal, la mandíbula, el maxilar y la lengua. Estos resultados sugieren que HES1 participa de manera muy importante en la regulación del desarrollo de la cresta neural craneal y de las estructuras que se derivan de ella.<sup>40</sup>

### ***Regulación de la expresión Hes1***

La expresión de *Hes1* se regula por la vía de señalización de Notch. Notch es una familia de receptores conservados, que se activan por la interacción célula-célula, mediante ligandos específicos, Delta-1, 3 y 4 y Jagged 1-2, a través de la interacción con cuatro posibles receptores Notch1-4.<sup>41</sup> Una vez activado Notch, se llevan a cabo una serie de cortes proteolíticos ( $\gamma$ -secretasa) que resultan en la liberación del dominio intracelular de Notch (NICD por sus siglas en inglés "Notch Intracellular domain").<sup>42</sup> NICD se transloca al núcleo y forma el complejo activador de la transcripción junto con la proteína de unión a DNA, CBF1. Este complejo reconoce una secuencia específica en sus genes blanco como *Hes1* promoviendo su transcripción y posteriormente su traducción para efectuar la función represora de genes como *Mash1* y *Ngn2*.<sup>43,44</sup> **(Figura 4)**

En células de ratón en cultivo, se encontró que los niveles de mRNA y proteína de HES1 son oscilatorias en respuesta al tratamiento con suero, expresándose cada 2-3 horas, así como también se observó que los progenitores neurales muestran este tipo de oscilaciones, esto permite la diferenciación de las células o el mantenimiento en un estado multipotente, en donde el incremento en la expresión inhibe la proliferación y la diferenciación de estas células. Por otro lado, también se evaluó la expresión de los transcritos de *Hes1* en CTE de ratón encontrándose que los niveles de *Hes1* también son oscilatorios, pero en un periodo de 3-5 horas. Estas oscilaciones contribuyen a que la respuesta en la diferenciación sea heterogénea.<sup>45,46</sup>





**Figura 4.- Regulación de la transcripción de *Hes1*.** La activación de la vía de Notch promueve la transcripción del mRNA de *Hes1*. *Hes1* se une a sus genes blanco y suprime su expresión. Modificado de Shimojo et al., 2011.

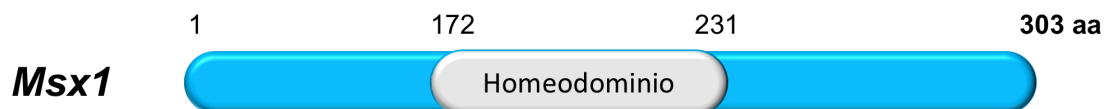
### ***Msx1* y su función en el desarrollo de la CN**

Los genes *Msx* codifican para factores transcripcionales que se caracterizan por su función represora<sup>47</sup> y se relacionan al gen *homeobox de segmentación muscular* de *Drosophila* (*msh*). Estos genes pertenecen a la familia de homeoproteínas (**Figura 5**). La función como regulador de la diferenciación se da por la represión de sus genes blanco, en particular la inhibición de la diferenciación de mioblastos, al inhibir a MyoD.<sup>48</sup> Se ha demostrado que MSX1 se localiza en la

periferia del núcleo, la cual es necesaria para que MSX1 reprima la expresión de sus genes blanco, esta localización se asocia con la marca represiva de la metilación de la histona 3 (H3K27me3) durante el desarrollo embrionario <sup>49</sup>. En los vertebrados, MSX1 y MSX2 participan en diferentes tipos celulares para controlar la proliferación, diferenciación <sup>50-55</sup> y supervivencia.

56

En el ratón, la familia de genes *Msx* se constituye por tres miembros, MSX1, MSX2 y MSX3, los cuales comparten una homología del 98% en su Homeodominio.<sup>57</sup> *Msx1* y *Msx2* se expresan durante la embriogénesis, en varios sitios de inducción epitelio-mesénquima como las extremidades, corazón, arcos branquiales y procesos craneofaciales, así como también en la región dorsal del tubo neural y cresta neural.<sup>58</sup> En el ratón, *Msx3* se expresa exclusivamente en la región dorsal del tubo neural, caudalmente hacia el istmo.

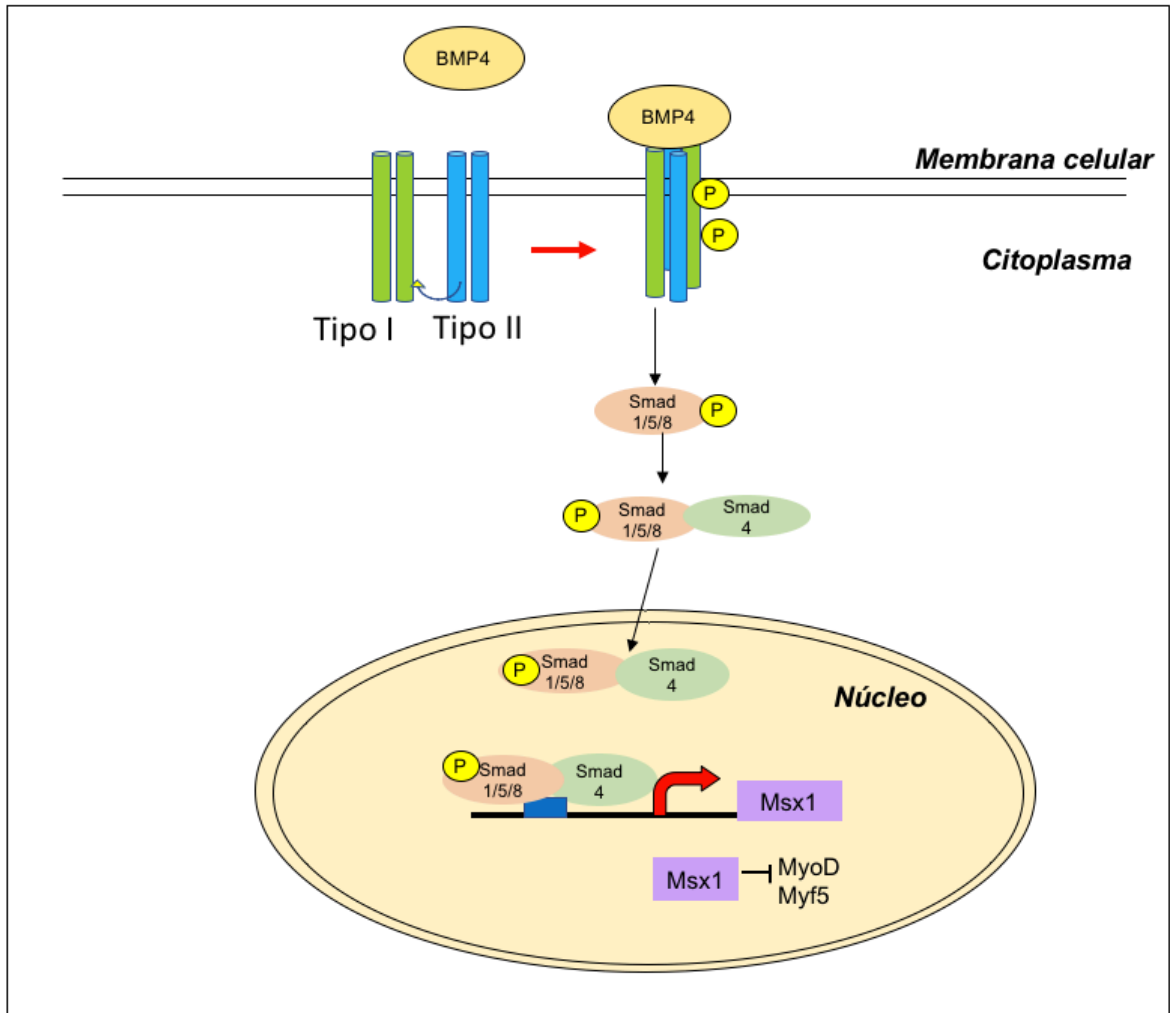


**Figura 5.- Estructura proteínica del factor transcripcional *Msx1*.** Contiene la región de Homeodominio para la unión a DNA. La secuencia proteínica de MSX1 se constituye por 303 aa.

En el ratón los homocigotos nulos de *Msx1*, mueren al momento del nacimiento con múltiples defectos craneofaciales, incluyendo el paladar hendido, así como la reducción de la mandíbula y del maxilar. <sup>59</sup> Otros estudios demostraron que la ausencia de *Msx1* y *Msx2* provocó una alteración en el patrón y la supervivencia de las células de la cresta neural craneal y cardíaca. La ausencia de estos genes aumentó la apoptosis de las células de la CN así como un retraso en su migración, promoviendo una alteración en la organización de los ganglios craneales así como una organización anormal en el desarrollo del corazón. <sup>60</sup>

## ***Regulación de la expresión Msx1***

La expresión de *Msx1* durante la embriogénesis requiere de un mecanismo de regulación muy preciso para que *Msx1* se exprese de una manera adecuada en un tiempo y espacio. Diferentes trabajos demostraron la regulación de *Msx1* y describieron tanto el efecto que tiene el incremento en la expresión como la delección de *Msx1* durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular.<sup>50,61</sup> Otros grupos demostraron la participación del Homeodominio y los diferentes residuos del transcrito de *Msx1* para la represión transcripcional, así como también definieron a una región del gen como el promotor basal para la regulación de la expresión de *Msx1*.<sup>62-64</sup> Por otro lado, hay evidencia que indica que *Msx1* se induce por las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs, por sus siglas en inglés "Bone Morphogenetic Proteins). Ensayos *in silico*, encontraron tres sitios de unión para las proteínas SMAD. Demostraron que el sitio de unión, en el promotor basal, SMAD8 es necesario para la activación transcripcional de *Msx1* y por otro lado, demostraron que *Msx1* se regula por un complejo proteico SP1/TBP (proteínas de unión a la caja TATA)/CBP que incrementa la transcripción al unirse al promotor basal.<sup>65-69</sup> **(Figura 6)**



**Figura 6.- Regulación de la transcripción de *Msx1*.** La activación de la vía de BMP's, permite la transcripción del mRNA de *Msx1*. MSX1 se localiza en la periferia del núcleo y suprime la expresión de sus genes blanco como MyoD y Myf5.

Lo anterior indica que ambos factores transcripcionales participan en la diferenciación hacia linajes de CN. Por lo tanto, evaluamos si la activación simultánea y regulada de los factores transcripcionales HES1 y MSX1 transgénicos, induce la diferenciación a derivados de la CN de mamíferos.

## **Receptor a glucocorticoides humano como sistema inducible**

Los glucocorticoides son hormonas de estrés primarias, sintetizadas en la corteza adrenal y liberadas al flujo sanguíneo en respuesta a estrés fisiológico y ambiental. Intracelularmente, los glucocorticoides interactúan con el receptor a glucocorticoides (GR) distribuido en el citoplasma y promueven su translocación del citoplasma hacia el núcleo. El GR activado por la hormona, se une a los elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs, por sus siglas en inglés Glucocorticoid response elements) en el DNA o interactúa con varios factores transcripcionales para incrementar o disminuir su expresión.<sup>70</sup> Las características de este receptor permiten utilizarlo como un sistema inducible para la translocación de genes desde el citoplasma hacia el núcleo de una manera controlada en respuesta a glucocorticoides sintéticos, como la Dex.<sup>27,31,71</sup>

## 2. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la ausencia de *Hes1* o *Msx1* promueven cambios morfológicos importantes en las estructuras derivadas de las células de la CN. Sin embargo, no se conoce cuál es la función de estos represores transcripcionales al elevar su expresión de forma regulada en una misma célula e inducir la diferenciación hacia derivados de la CN.

## 3. HIPÓTESIS

La activación simultánea de los factores transcripcionales HES1 y MSX1, con un sistema inducible, en células troncales embrionarias de ratón, facilitará la diferenciación hacia células de la cresta neural *in vitro*.

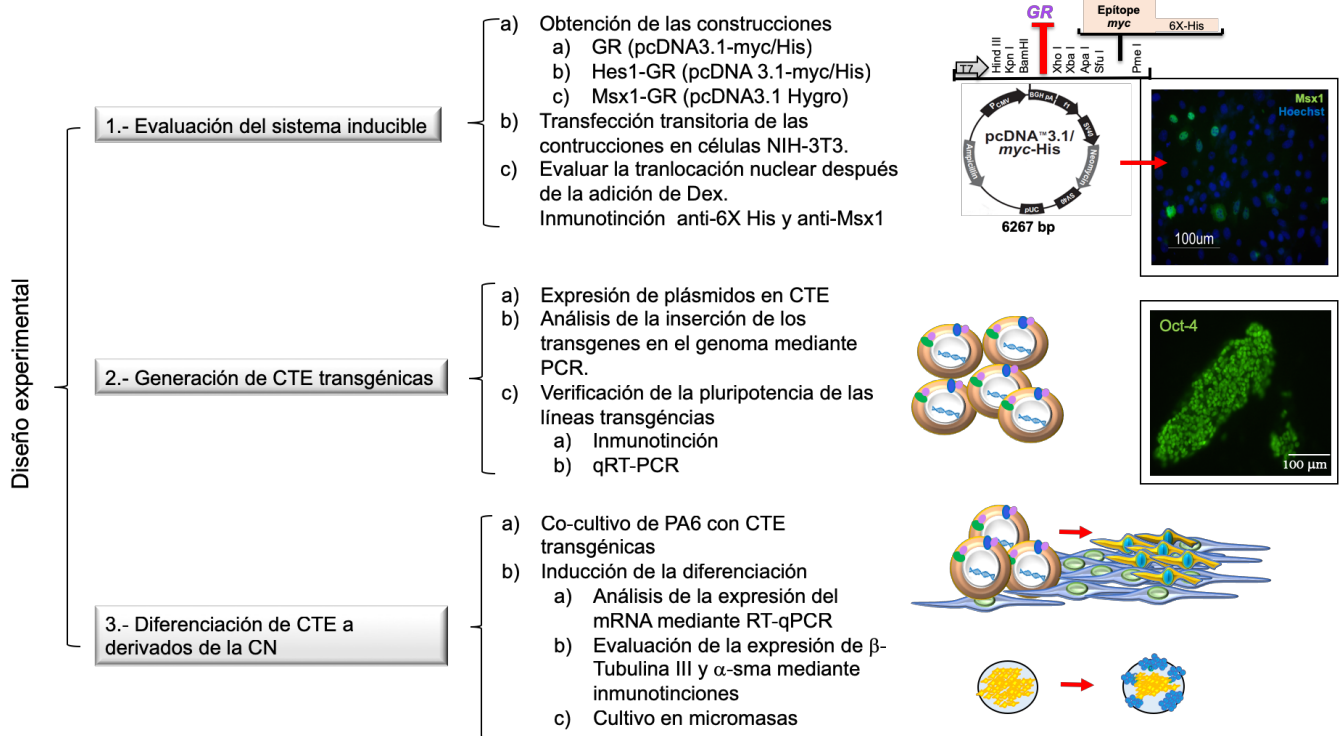
## 4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la activación simultánea de HES1 y MSX1 incrementa la diferenciación de células troncales embrionarias de ratón a derivados de la cresta neural.

### **Objetivos particulares:**

1. Probar si las formas inducibles de HES1 y MSX1 responden a la adición de glucocorticoides en células de mamífero transfectadas transitoriamente.
2. Establecer líneas de células troncales embrionarias que contengan los transgenes inducibles de HES1, MSX1 Y HES1+MSX1 que respondan a la adición de glucocorticoides.
3. Usar protocolos de diferenciación en las células troncales embrionarias transgénicas, estableciendo si estas variantes favorecen la inducción de la cresta neural.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cultivo celular*

#### **Fibroblastos embrionarios de ratón NIH-3T3**

Los fibroblastos embrionarios de ratón, NIH-3T3, se mantuvieron en cultivo bajo las siguientes condiciones. Medio para cultivo Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con: 10% de Suero Fetal Bovino (FBS, por sus siglas en inglés, Fetal Bovine Serum), 2 mM de Glutamax (GIBCO) y 50 U/mL de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific). Las células se mantuvieron en cajas de cultivo de 10 cm, previamente tratadas con 0.1 % de gelatina (Sigma), 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

## **Células troncales embrionarias de ratón**

Las células troncales embrionarias de ratón, W9.5, se mantuvieron en cultivo con medio Knock-out Dulbecco's Modified Eagle Medium (KO-DMEM) suplementado con 15% de FBS, 1000 U/mL del factor inhibitorio de Leucemia (LIF, por sus siglas en inglés, Leukemia Inhibitory Factor), 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de Glutamax (GIBCO) 55  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol, 50 U/ml penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific). Para mantener a las células en estado pluripotente, se agregó el inhibidor de GSK3 (3 $\mu$ M CHIR99021, Millipore) y el inhibidor de ERK (1  $\mu$ M PD0325901, Sigma), también conocidos como 2i.

## **Células estromales con actividad inductora (células PA6)**

Las células estromales PA6 se mantuvieron en cultivo en Minimum Essential Media ( $\alpha$ -MEM) suplementado con 10% FBS y 50 U/ml penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific). Las células PA6 se mantuvieron en cajas de cultivo, previamente tratadas con 0.1% de gelatina, 5% CO<sub>2</sub> y a 37°C. Las células fueron inactivadas mitóticamente con 10  $\mu$ g/mL de Mitomicina C y se mantuvieron durante 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 2 horas, las células se lavaron 2 veces con PBS y se mantuvieron en cultivo con  $\alpha$ -MEM durante 24 horas. Las células se cosecharon y se sembraron 1x10<sup>5</sup> células por pozo de una caja de 24 pozos, para realizar los ensayos de inducción de la diferenciación.

## ***Diseño y construcción de los transgenes***

El diseño de proteínas inducibles por hormonas permite controlar el tiempo en el que estas ejercen su acción.<sup>72,73</sup> Para controlar la expresión elevada temporal de *Hes1* y *Msx1*, se amplificó el sitio de unión al ligando del receptor a glucocorticoides humano (hGR) con oligonucleótidos específicos, la secuencia se muestra en la tabla 1.<sup>31</sup> hGR se clonó en marco de lectura y río arriba, entre los sitios de restricción SacI y XhoI, de la secuencia que codifica para *myc*-His-tag, para obtener la construcción hGR-pcDNA3.1-*myc*-His (GR). Este plásmido control sólo expresa



el hGR y el myc-His tag y su tamaño es de 6267 pb, el plásmido resultante se encuentra en la tabla 2. La secuencia del marco de lectura abierto (ORF, del inglés “Open Reading frame”) de *Hes1* y la secuencia ORF de *Msx1* de *Mus musculus*, fueron amplificadas mediante una PCR de alta fidelidad del cDNA de *Hes1* y de *Msx1*, utilizando los oligonucleótidos específicos (Tabla 1). Para *Hes1*, se amplificó a partir de la clona ID 6478994 (cat. # MMM1013-9200434, Openbiosystems libraries) y para *Msx1* a partir de la clona ID 4923403 (cat. # MMM1013-202766935, Openbiosystems libraries), una vez que los amplicones fueron purificados, cada uno se ligó al vector pCR-Topo-TA. El fragmento amplificado codifica para *Hes1*, 284 residuos de aminoácidos sin el codón de paro y contiene los tres dominios estructurales, bHLH, Orange y WRPW. *Msx1* contiene los tres dominios estructurales, el dominio represor, el Homeodominio (sitio de unión al DNA) y la secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés “nuclear localization sequence”). Los vectores pTopo-*Hes1* y pTopo-*Msx1* se digirieron y se sub-clonaron entre los sitios HindIII y BamHI del vector que contiene a GR para obtener las construcciones: *Hes1-GR-pcDNA3.1-myc-His* (*Hes1-GR*) con un tamaño de 7034 pb y *Msx1-GR-pcDNA3.1-myc-His*, ambos con resistencia al antibiótico G418. Para poder tener un plásmido con una resistencia a antibiótico diferente a G418, *Msx1-GR* se sub-clonó entre los sitios HindIII y XhoI del plásmido pcDNA3.1-Hygromicina, para obtener la construcción *Msx1-GR-pcDNA3.1-Higromicina* (*Msx1-GR*) con un tamaño de 7035 pb. Los plásmidos resultantes se muestran en la tabla 2. Se utilizaron células bacterianas DH5 $\alpha$  para expandir los plásmidos. Las colonias fueron seleccionadas con 100  $\mu$ g/mL de Ampicilina (Sigma, A0166). Se extrajo el DNA plasmídico utilizando el kit Miniprep (Qiagen), cada construcción se verificó mediante secuenciación.

### ***Evaluación de la funcionalidad del sistema inducible***

Para evaluar la funcionalidad de las construcciones, se utilizaron células NIH-3T3 por su facilidad para transfectar y por su crecimiento en monocapa. Se sembraron  $2 \times 10^4$  células por pozo en una

placa de 24 pozos y se cultivaron en medio DMEM sin rojo de fenol (31-053-028, GIBCO) suplementado con 10% de FBS pre-adsorbido con carbón activado (Sigma). Después de 24 horas, las células se transfectaron con 800 ng de DNA plasmídico, se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) como lípido catiónico para permitir la incorporación del DNA plasmídico a la célula. Después de 48 horas de transfección, las células fueron estimuladas con 10 y 100  $\mu$ M de Dexametasona (Dex; D2915, Sigma). Después de 24 horas, las células se fijaron con 4% de para-formaldehído (PFA) en PBS 1X y se hizo una inmunofluorescencia con anticuerpos específicos como está descrito en la sección de tinción para inmunofluorescencia. La translocación nuclear se cuantificó utilizando el software Image J. Brevemente, utilizando la herramienta de dibujo (forma libre), se seleccionó el núcleo de cada una de las células con tinción positiva para 6X-His tag y MSX1. Para eliminar la señal de fondo, se seleccionó la región adyacente a la célula que no tenía fluorescencia. Se consideró la densidad integrada y el promedio de “grey value” para calcular la fluorescencia corregida de la célula (CCF), utilizando la siguiente ecuación:  $CCF = \text{Densidad Integrada} - (\text{Área de la célula seleccionada} \times \text{promedio de la fluorescencia del fondo "grey value"})$ . Se contaron 100 células en cada experimento. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes.

### ***Generación de líneas de CTE de ratón transgénicas***

Para obtener células troncales embrionarias de ratón (células W9.5) que expresaran de forma estable cada una de las construcciones, se tomaron  $2.5 \times 10^6$  CTE y se electroporaron con 3  $\mu$ g de cada DNA plasmídico; GR, *Hes1-GR*, *Msx1-GR* y *Hes1-GR+Msx1-GR*, se utilizó el sistema de nucleofección (Lonza) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Después de la electroporación, las células se mantuvieron en cultivo con KO-DMEM suplementado, para mantener la pluripotencia se adicionaron al medio de cultivo LIF y 2i. Dos días después de la electroporación, las CTE que incorporaron el DNA plasmídico se seleccionaron durante 10 días

con: 300 µg/mL de G418 para GR y Hes1-GR y con 200 µg/mL de Higromicina para las clonas positivas para Msx1-GR. Las clonas se expandieron y se mantuvieron en cultivo en presencia de 100 µg/mL de G418 y/o 110 µg/mL de Higromicina B.

### ***Análisis de la inserción de los transgenes***

Para determinar si el DNA plasmídico se integró al genoma de las CTE, se extrajo el DNA de las clonas resistentes y se evaluó la presencia de GR, HGR y MGR mediante PCR punto final, utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 3).

### ***Inducción de diferenciación de CTE a CCN***

Las CTE se cosecharon utilizando TripleXpress (Gibco) y se resuspendieron en medio fresco DMEM suplementado sin rojo de fenol. Las células se contaron y se co-cultivaron con las células PA6 inactivadas mitóticamente. Se colocaron  $2.5 \times 10^3$  células/mL por pozo de una caja de 24 pozos y se dejaron en co-cultivo durante 8 días en medio de diferenciación (DMEM sin rojo de fenol, 10% FBS pre-adsorbido con carbón activado, 2 mM Glutamax, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio y 0.1 mM de 2-mercaptoetanol).

Con base en lo descrito por Mizuseki y cols., para inducir la diferenciación hacia cresta neural, al día 5 de co-cultivo con las células PA6, se agregó 0.5 nM de BMP4.<sup>17</sup> Al día 8 de diferenciación, las células se cosecharon con papaína y se sembraron en pozos previamente tratados con fibronectina. Las células se mantuvieron en cultivo durante 48 horas en medio de diferenciación suplementado con 15% de extracto de embrión de pollo.<sup>74</sup> Después de este tiempo, las células se cosecharon para realizar la extracción de RNA y por otro lado se fijaron con PFA al 4% para hacer inmunotinciones. Para la diferenciación de las líneas celulares transgénicas se siguió el protocolo antes mencionado y la activación de la construcción de Hes1 y/o Msx1 se hizo con la

adición de Dex [10  $\mu$ M]. El estímulo inició desde el día 1 de diferenciación. El medio de diferenciación se cambió cada tercer día, así como la Dex. **(Figura 7)**

### ***Cultivo en micromasas y tinción con azul alciano***

Para obtener cultivos en micromasas, las CTE de ratón se co-cultivaron con las células estromales PA6, de acuerdo con el protocolo previamente descrito. Al día 8 de diferenciación, las células se cosecharon y se cuantificó el número total de células. Para tener el cultivo en micromasas, se tomaron  $2 \times 10^5$  células y se resuspendieron en un volumen de 10  $\mu$ l de medio de diferenciación. Se tomaron los 10  $\mu$ l de la suspensión y se colocaron en el centro del pozo de una placa de 24 pozos. Las células, se dejaron en cultivo durante 3 h a 37 °C para su adhesión y posteriormente se agregaron 500  $\mu$ l de medio de diferenciación sin perturbar la gota de células (día 0). Las células se cultivaron durante 3 y 10 días. El medio de diferenciación se cambió cada tercer día. En el día 1 de cultivo se adicionó la Dex para continuar con la expresión constitutiva de Hes1 y/o Msx1, respectivamente. Después de 3 o 10 días, los cultivos en micromasas se lavaron con PBS. Para fijar las células se utilizó la solución de Khale, la solución se agregó y se dejó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la solución de Khale y las células se cubrieron con una solución de Azul alciano (0.5% de azul alciano en HCl 0.1N). El azul alciano es un colorante básico que se utiliza para identificar los polisacáridos ácidos por los glicosaminoglicanos y proteoglicanos presentes la matriz extracelular de los condrocitos que forman el cartílago. Los cultivos se incubaron durante dos días a temperatura ambiente y en agitación leve. Después de la incubación con el azul alciano, los cultivos se lavaron dos veces con HCl [0.1 N] durante 5 minutos. Los cultivos se guardaron en PBS a 4 °C hasta la adquisición de las imágenes resultantes.<sup>75</sup> **(Figura 7)**

Las imágenes se adquirieron con un microscopio invertido (Nikon DIAPHOT) y se digitalizaron a 8 bits. Estas imágenes se procesaron, se eliminó el fondo y se agregó un filtro “Cyan Hot” utilizando el programa de acceso libre Fiji (**Figura 18 A-H**).

Las imágenes tomadas con una alta magnificación se adquirieron con un microscopio invertido Nikon eclipse TE2000-U y se realizó un ajuste mínimo al brillo y al contraste. (**Figura 18 I-X**)

### ***Extracción de RNA y síntesis de cDNA***

Se extrajo el RNA total de las células utilizando el reactivo TRIZOL (Molecular Research Center, Inc). La integridad del RNA se observó en un gel de agarosa al 1% y se visualizó mediante la incorporación de bromuro de etidio. Para sintetizar el cDNA, se utilizó 1 µg de RNA y se llevó a cabo una retro-transcripción utilizando dNTPs (Promega), 100 U de retro-transcriptasa *Superscript III*, 500 ng de oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen), se siguieron las instrucciones del fabricante.

### ***Amplificación génica***

#### ***RT-PCR punto final***

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 300 ng de cDNA, 2U de DNA *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen), 10 µM dNTPs (Promega), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) y 0.5 µM de los oligonucleótidos específicos (Tabla 4). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis para determinar el peso molecular después de la tinción con bromuro de etidio. Las reacciones con RNA en ausencia de retro-transcripción se incluyeron como control negativo de la reacción. El gen endógeno, β-actina, se utilizó para normalizar la expresión de los genes. La expresión de los genes de las líneas celulares transgénicas diferenciadas en la condición control se compararon con los derivados obtenidos después del tratamiento con Dex.

### ***RT-PCR cuantitativo***

Se extrajo el RNA de las células y se realizó la reacción de retro-transcripción para obtener el cDNA. Se evaluó la expresión de los genes de pluripotencia y genes de diferenciación en cada una de las líneas celulares. La amplificación de cada gen se realizó con oligonucleótidos específicos (0.3  $\mu$ M de cada oligonucleótido) y utilizando el kit "iTaQ Universal SYBR Green Supermix" (Bio-Rad). Para la reacción de PCR se usó el termociclador de tiempo real CFX96 (Bio-Rad), la reacción se realizó durante 40 ciclos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en la tabla 5. Los experimentos se hicieron por triplicado.

### ***Inmunotinción***

Las células se fijaron con 4% de PFA durante 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el PFA y las células se lavaron tres veces con PBS. Para permeabilizar las células, se preparó buffer para permeabilizar (0.5% de Tritón X-100 en PBS 1X) y se dejó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el buffer para permeabilizar y se agregó solución de bloqueo (10% de suero normal de cabra en PBS 1X) y se dejó incubando al menos 1 hora. Se agregó el anticuerpo primario según corresponda y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario y las células se lavaron 5 veces durante 5 minutos en agitación con 0.1 % de BSA en PBS 1X. Se agregó el anticuerpo secundario y se dejó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el anticuerpo secundario y las células se lavaron 5 veces durante 5 minutos en agitación con 0.1 % de BSA en PBS 1X. La tinción de los núcleos se hizo con 1X del reactivo de Hoechst 33342 (Sigma). Los anticuerpos que se usaron y las diluciones, se muestran en la tabla 6.

## ***Análisis estadístico***

Los datos mostrados son el resultado de al menos tres experimentos independientes. Los resultados son el promedio  $\pm$  SEM. Los datos se analizaron con un análisis de varianza ANOVA de una o dos vías y se realizó una comparación múltiple de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Expresión de Hes1 y Msx1 en CTE tipo *silvestre* en condiciones pluripotentes y diferenciadas hacia CN

Para evaluar la función de Hes1 y Msx1 en la diferenciación de las CTE de ratón hacia derivados de la CN, se usó la actividad inductora de las células estromales PA6 durante 5 días<sup>6</sup>, posteriormente se agregó BMP4 para inducir el compromiso hacia derivados de la CN.<sup>17</sup> Los cultivos se trataron desde el día 5 hasta el día 8 con 0.5 nM de BMP4. Al día 8, las células se cosecharon mediante el tratamiento con Papaína y sembradas en cajas cubiertas con fibronectina en medio de diferenciación neural con extracto de embrión de pollo sin BMP4, una condición que favorece la diferenciación hacia células de músculo liso ( $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>) y derivados neurales ( $\beta$ -Tubulina III<sup>+</sup>). (Figura 7)

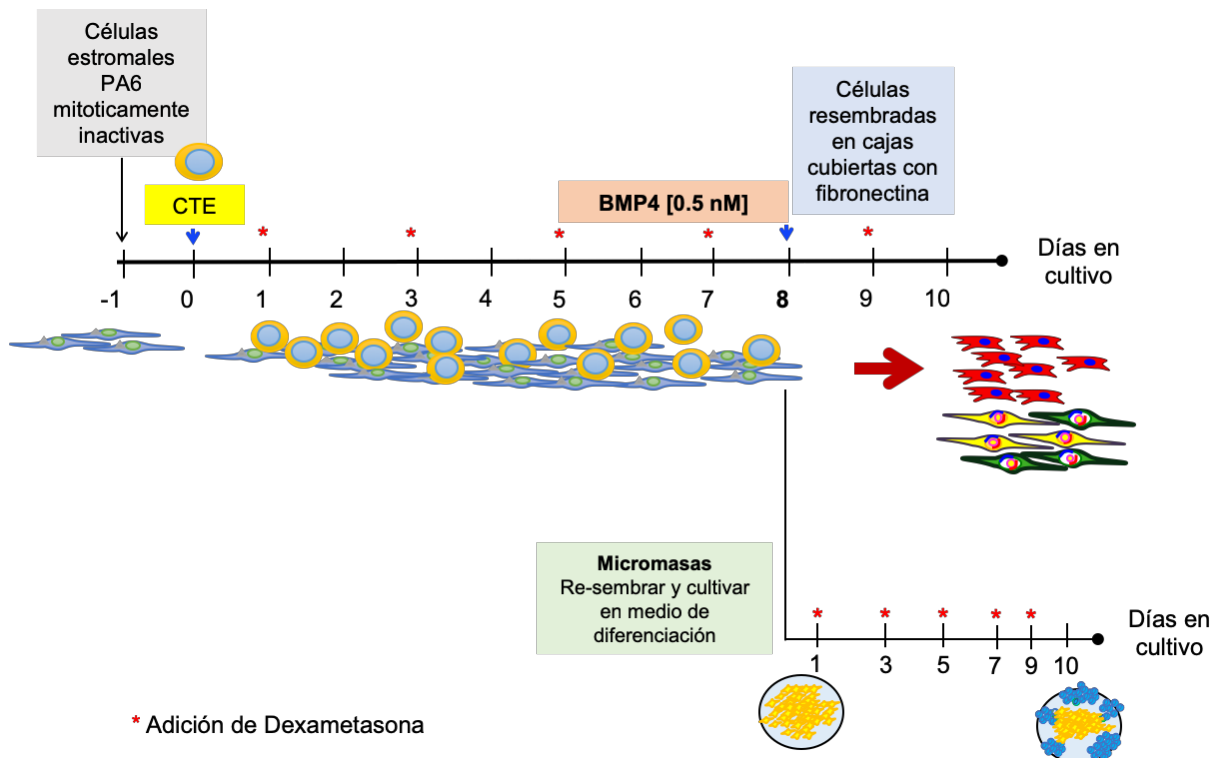
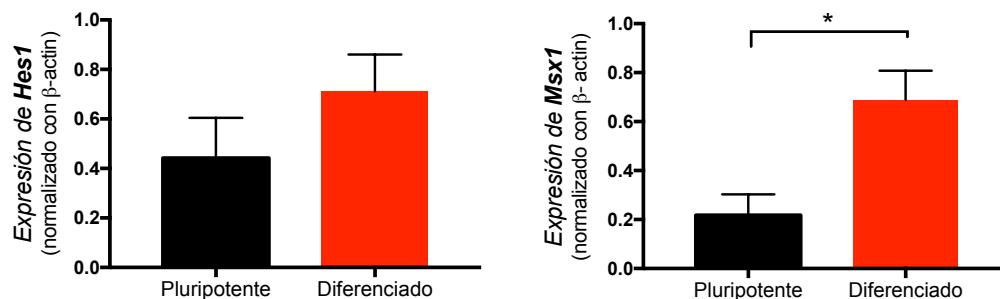


Figura 7. Diferenciación de células pluripotentes a derivados de la cresta neural y cultivo en micromasas. El esquema muestra el protocolo de diferenciación hacia derivados de la cresta neural. Las



células estromales PA6 se activaron mitóticamente y sembradas como una monocapa de células para inducir la diferenciación neural de las CTE de ratón. La adición de BMP4 promovió la adquisición del destino a cresta neural. Después de 10 días de diferenciación, se detectaron neuronas, células de músculo liso y condrocitos. Para la identificación de condrocitos, se hicieron cultivos en micromasas después de 8 días de diferenciación y se mantuvieron en cultivo por 10 días mas. Las puntas de flecha en azul indica cuando se sembraron las células. Los asteriscos en rojo indican la adición de Dex para promover la translocación nuclear de las diferentes construcciones.

Para evaluar los niveles de expresión endógena de Hes1 y Msx1 en células pluripotentes silvestres, se extrajo el RNA de células en cultivo con 2i/LIF sin Dex. En las células W9.5 que se sometieron al protocolo de diferenciación de CN, no observamos un incremento significativo en la expresión de Hes1, sin embargo, observamos un incremento significativo en la expresión de Msx1. **(Figura 8)** Estos resultados indican que una elevada regulación de Msx1 se observó después de la inducción hacia CN. Sin embargo, no se sabe si la estimulación sostenida y controlada, promoviendo la translocación nuclear de uno o los dos factores transcripcionales influye en el compromiso hacia CN durante la diferenciación de las células pluripotentes. Por lo anterior, el sistema inducible nos ayudará a corroborar esta idea.



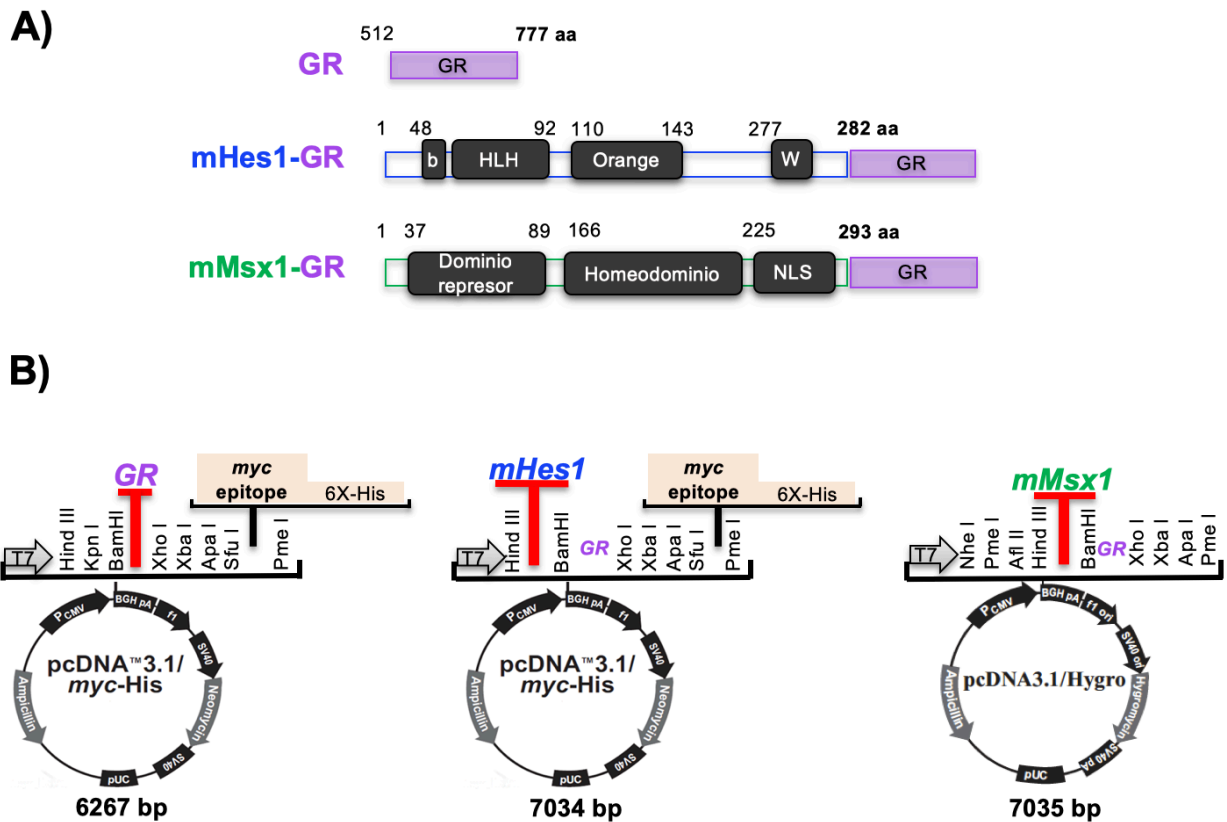
**Figura 8. Expresión de Hes1 y Msx1 en condiciones pluripotentes y en células diferenciadas a CN.**

Mediante RT-PCR semi-cuantitativo se cuantificaron los transcritos endógenos de estos dos genes en células pluripotentes W9.5 cultivadas en 2i/LIF, y después de 10 días de diferenciación en células PA6. La expresión de Hes1 incrementó de manera no significativa. Por otro lado, detectamos un incremento

significativo en la expresión de Msx1 después de la diferenciación hacia CN. Se muestra el promedio  $\pm$  SEM. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, se hicieron comparaciones y se aplicó la prueba de Tukey para evaluar si había diferencias. \* $p= 0.032$

## 7.2 Construcción de plásmidos e inducción de la localización nuclear

Para tener un sistema inducible, se clonaron las secuencias de cDNA de GR ó Hes1-GR (**Figura 9A**) en el vector pcDNA3.1/myc-His, el cual tiene un tag de 6 Histidinas (6X tag), que sirve para ser reconocido con un anticuerpo específico. Por otro lado, también se sub-clonó el cDNA de Msx1-GR (**Figura 9A**) en el vector pcDNA3.1-Higromicina B entre los sitios de HindIII y BamHI (**Figura 9B**). Los plásmidos resultantes se denominaron GR, HGR y MGR respectivamente (**Figura 9B**).

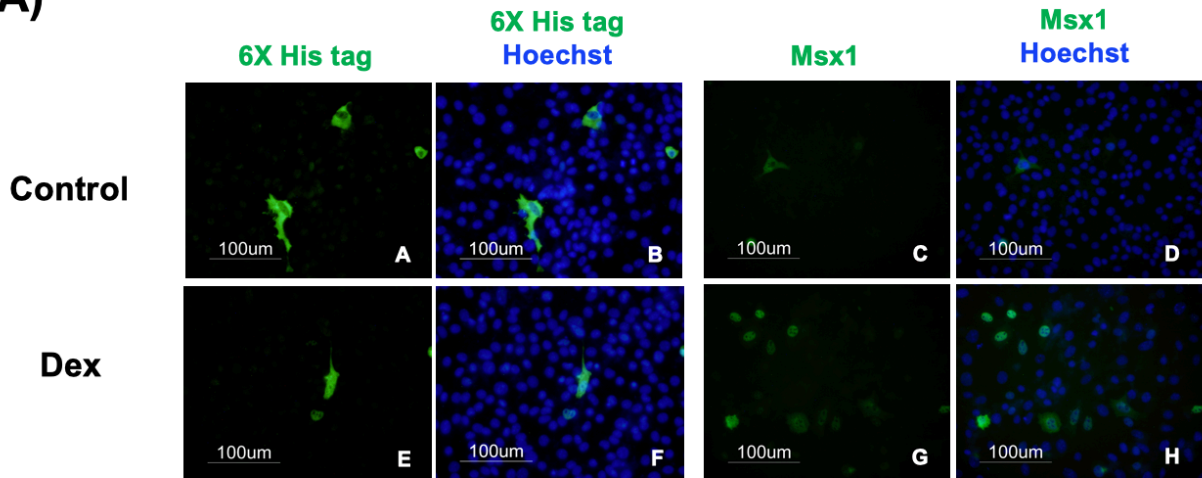


**Figura 9.- Generación de células troncales embrionarias de ratón transgénicas que expresan Hes1 y Msx1.** **A)** Esquema del sitio de unión a ligando del receptor de glucocorticoide humano (GR) que servirá como plásmido control. Esquema de las regiones de *Hes1* y *Msx1* que se fusionaron con GR. **B)** El cDNA del GR fue clonado en el vector pcDNA3.1/myc-His, obteniéndose un tamaño de 6267 pb; Este plásmido se usó para clonar en marco de lectura a *Hes1* y *Msx1*, obteniéndose un plásmido de 7034 pb para HGR. La construcción obtenida de *Msx1*-GR fue sub-clonada, usando los sitios de restricción HindIII y XhoI en el plásmido pcDNA3.1/Hygro, obteniéndose un plásmido de 7035 pb.

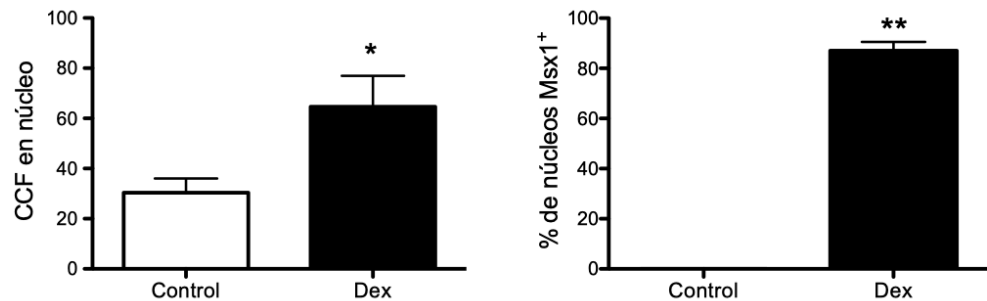
Para evaluar la funcionalidad del sistema inducible con Dex, los plásmidos se transfectaron transitoriamente en fibroblastos 3T3. Se evaluó la translocación nuclear con diferentes concentraciones de Dex (10, 50 y 100  $\mu$ M) para determinar la concentración a la cual se presentaba la mayor translocación nuclear. Observamos que con 100  $\mu$ M se obtuvo el mayor % de translocación nuclear. **(Figura 10A)** La cuantificación de la translocación nuclear se hizo obteniendo la fluorescencia de la célula corregida (CCF= Densidad Integrada - (Área de célula seleccionada \* Fluorescencia media del *background*)). Después de calcular la CCF, observamos que la adición de Dex incrementó la CCF en el núcleo. Con respecto a *Msx1*, sólo se cuantificaron las células que mostraron señal en el núcleo y se expresó como el porcentaje de células MSX1 con marca positiva nuclear. **(Figura 10B)**

Con base en estos resultados, las CTE transgénicas se trataron con 10  $\mu$ M de Dex, la translocación nuclear se evaluó por inmunotinción, sin embargo la visualización fue complicada debido a que la proporción de núcleo:citoplasma en las CTE, en donde el área del núcleo es mayor que la del citoplasma. Por otro lado, los experimentos de diferenciación se hicieron con 10  $\mu$ M de Dex debido a que con 100  $\mu$ M disminuyó el número de células al término de la diferenciación.

**A)**



**B)**



**Figura 10. Expresión e inducción de la translocación nuclear de los transgenes.** Se hicieron transfecciones transitorias en células de fibroblastos embrionarios de ratón NIH3T3 con las construcciones **A)** HGR (imagen izquierda) o MGR (imagen derecha). Después de 48 horas de la transfección, las células se trataron con 100 µM de Dex y se dejaron en cultivo durante 24 horas. La translocación nuclear se evaluó con anticuerpos específicos para identificar a Hes1 con el anti-6X-His tag ó Msx1, respectivamente. **B)** Cuantificación de la fluorescencia corregida de 6X-His tag en el núcleo para células sin tratar o células estimuladas con Dex. Para Msx1, se calculó el porcentaje de núcleos positivos para Msx1 después de la adición de Dex. Análisis estadístico *t*-student \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

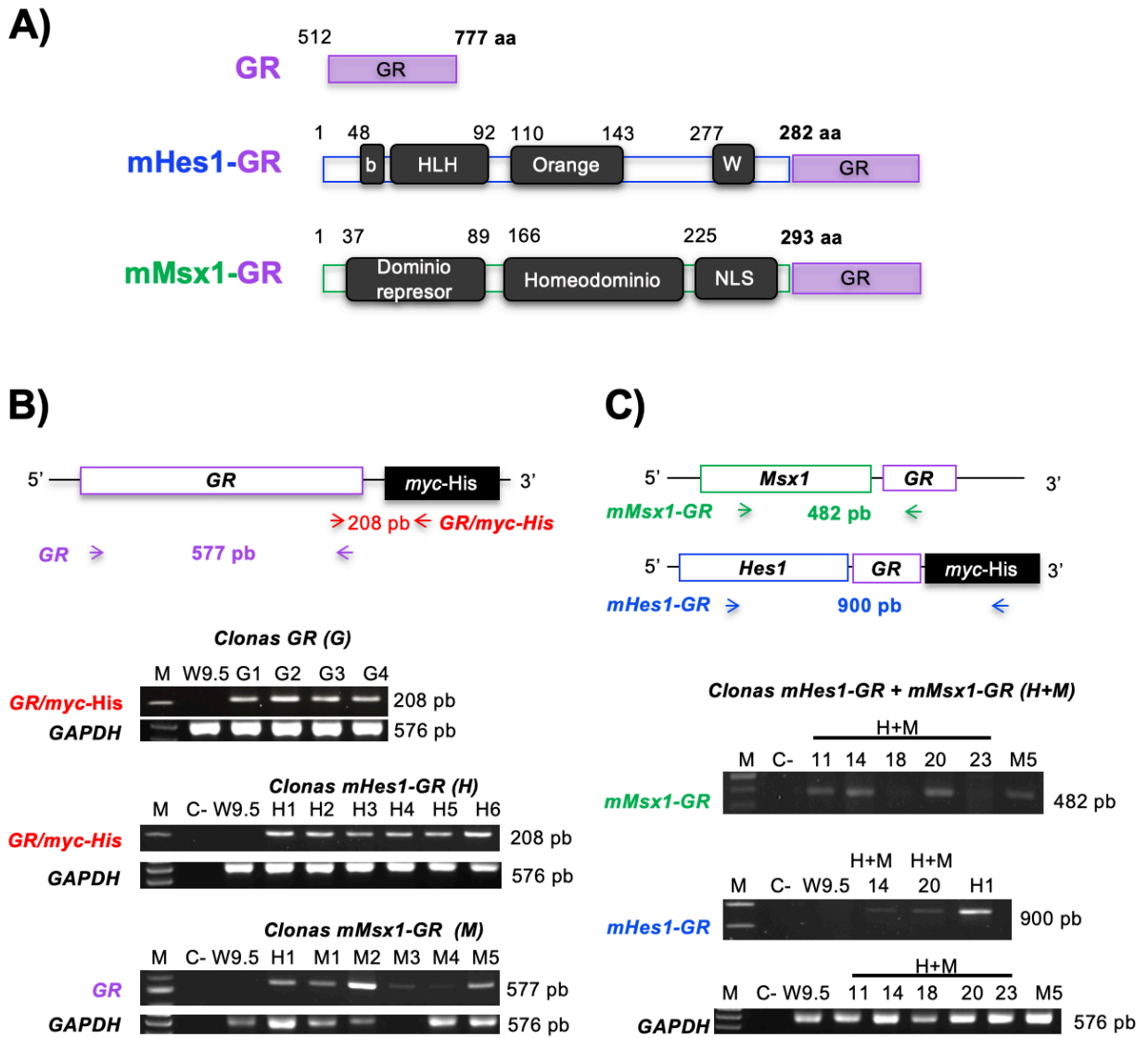
### 7.3 Obtención de CTE transgénicas con GR, HGR, MGR o HGR+MGR

Las CTE de ratón W9.5, se electroporaron con los plásmidos GR, HGR, MGR o HGR+MGR. Después de la electroporación, las células se trataron con el antibiótico de selección. Las células

que incorporaron GR o HGR se seleccionaron con 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de G418, con 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Higromicina B para las que incorporaron MGR y para las dobles transgénicas se utilizaron ambos antibióticos. La selección de las clonas resistentes a los antibióticos se hizo durante 10 días, para posteriormente aplicar una concentración de mantenimiento, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 110  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, durante 11 días más. Después de este tiempo, se observaron varias colonias, la cuales se seleccionaron y se expandieron en medio KO-DMEM suplementado, se agregó LIF y 2i para mantener la pluripotencia y el antibiótico de selección a la concentración de mantenimiento.

#### **7.4 Análisis de la incorporación de los transgenes en las clonas resistentes.**

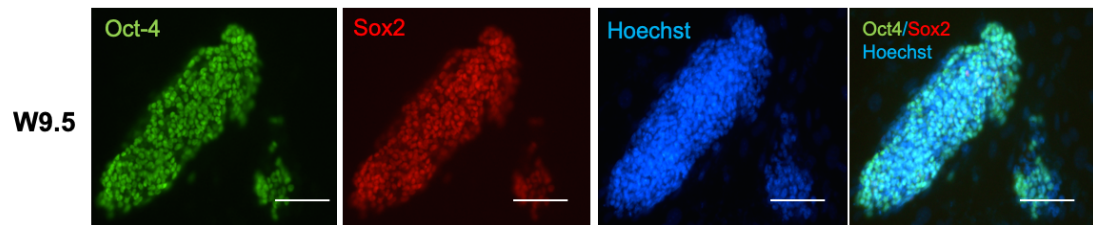
Para identificar si se incorporaron los transgenes en el genoma de las células que resultaron resistentes a los antibióticos, se extrajo el DNA genómico de cada una de las clonas resistentes al antibiótico de selección. Se usaron oligonucleótidos específicos (tabla 3) para GR/myc-His (208 pb), GR (577 pb), MGR (482 pb) ó HGR (900 pb). El sitio de hibridación y el tamaño del amplicón generado por los oligonucleótidos se muestra en el esquema presentado en la figura 11B y 11C. El gen endógeno que se usó fue GAPDH (576 pb). Después del análisis de la incorporación de los transgenes, identificamos varias clonas que incorporaron los diferentes transgenes; GR (cuatro clonas), HGR (seis clonas), MGR (cinco clonas) y HGR+MGR (dos clonas). **(Figura 11)**



**Figura 11. Obtención y análisis de CTE de ratón que incorporaron a *Hes1* y/o *Msx1*.** **A)** Esquema del dominio de unión al ligando del receptor de glucocorticoide humano (GR). Control de la transfección. También se muestra la longitud del cDNA de *Hes1* y *Msx1* que fueron clonados en marco con GR para producir los plásmidos mHes1-GR (HGR) o mMsx1-GR (MGR). **B)** Después de la electroporación y la selección de las CTE transgénicas, la incorporación de los transgenes en cada una de las clonas se evaluó mediante la amplificación del DNA genómico, por PCR, con oligonucleótidos específicos. El fragmento de GR se identificó con dos pares de oligonucleótidos para identificar a las clonas, designadas como G (GR). Para las células que se electroporaron con Hes1-GR (HGR) o Msx1-GR (MGR), varias clonas fueron identificadas como positivas y se designaron como H (HGR) o M (MGR) respectivamente. **C)** Las CTE fueron transfectadas con los dos plásmidos, *Hes1*-GR+*Msx1*-GR. Para identificar las clonas doble-

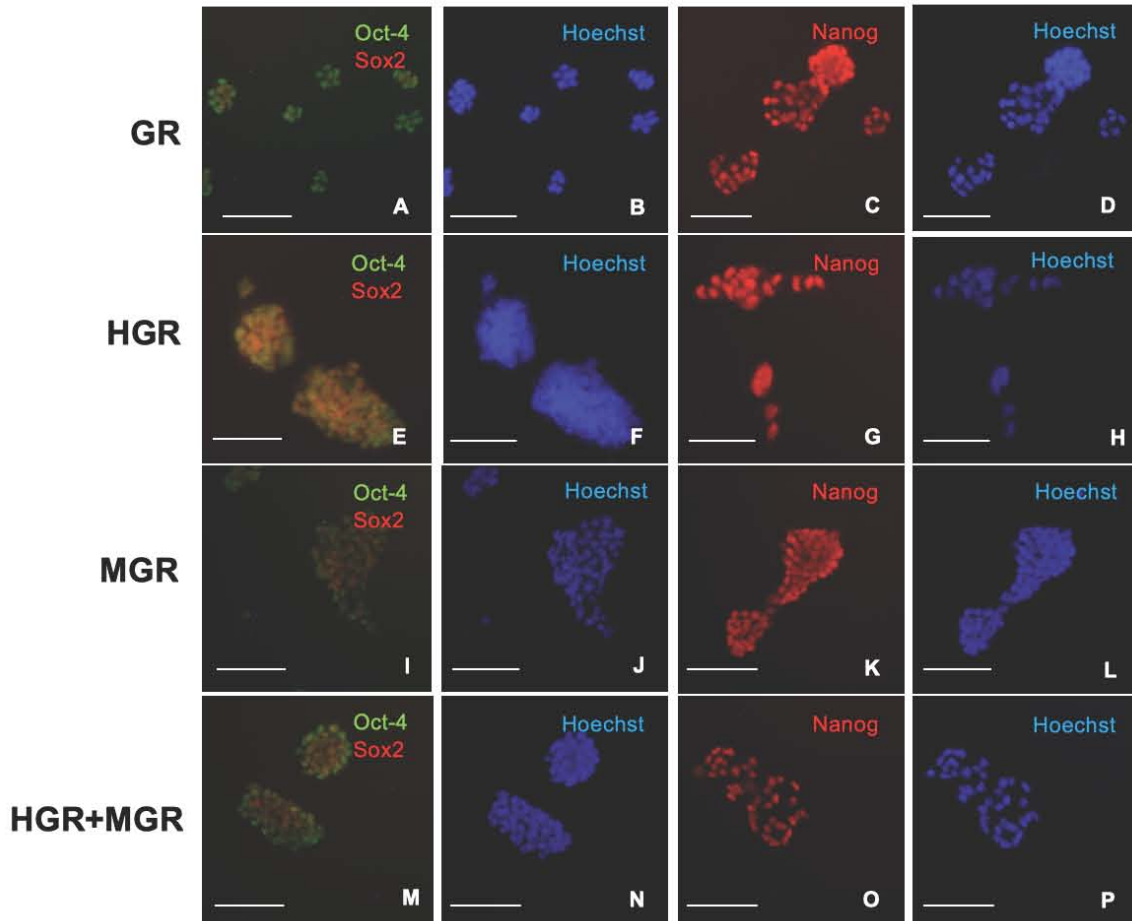
positivas (H+M), los oligonucleótidos que se muestran fueron los que se utilizaron para la amplificación. Las clonas 14 y 20 incorporaron ambas construcciones. El DNA genómico de las CTE W9.5 se usó como control negativo de la incorporación de los transgenes. (C-) indica que el control negativo de la reacción, la reacción contiene agua, en lugar de DNA.

Para evaluar si los transgenes afectaron los marcadores de pluripotencia de las células, se hicieron inmunotinciones para identificar a OCT4, SOX2 Y NANOG, tanto en la línea parental W9.5 como en las líneas transgénicas. Las células W9.5 y las líneas transgénicas expresaron los marcadores de pluripotencia (**Figura 12 y 13A**). Por otro lado, se evaluó la expresión del mRNA, mediante RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR), de cada uno de los marcadores de pluripotencia. Observamos que los niveles de *Oct4*, *Sox2* y *Nanog* fueron similares en las líneas transgénicas, con un incremento significativo de *Sox2* en las células HGR (Fig. 13B)

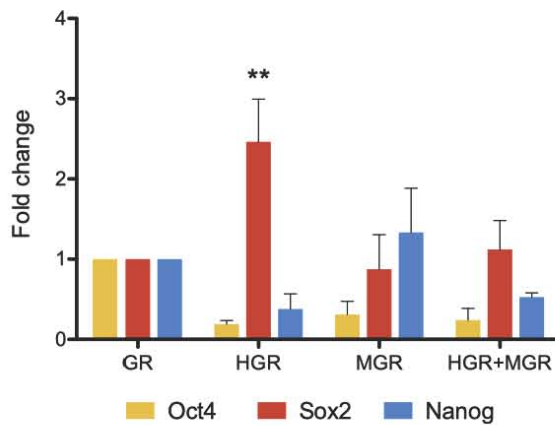


**Figura 12. Las CTE de ratón expresaron los marcadores de pluripotencia.** Se evaluó la expresión de *Oct4* y *Sox2* en las células silvestres W9.5 mediante inmunotinciones. La tinción de los núcleos (azul) se hizo con el reactivo de Hoechst. La barra representa 100  $\mu$ m.

A)



B)



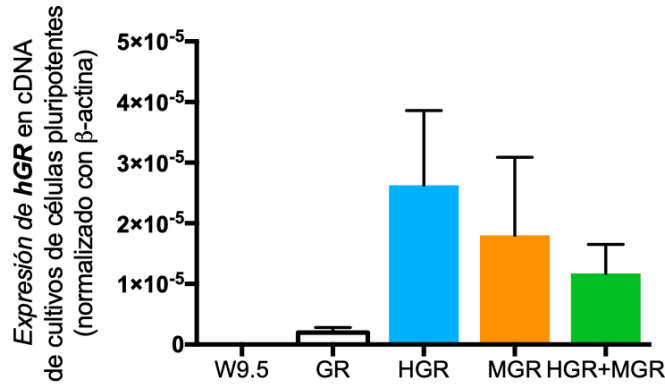
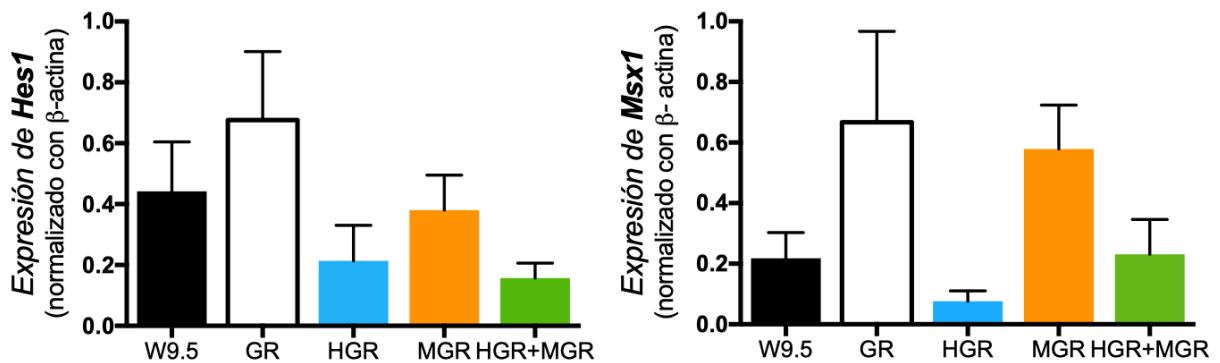
**Figura 13. Las CTE transgénicas se mantuvieron pluripotentes.** Se evaluó la expresión de *Oct4*, *Sox2* y *Nanog* de las células transgénicas mediante **A)** Inmunofluorescencia con anticuerpos específicos. Se observó que las clonas seleccionadas continuaron expresando los factores de pluripotencia. **B)** RT-qPCR



para cada una de las células transgénicas. Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido por comparación múltiple de Tukey, indicando diferencia significativa en la expresión de Sox2 para Hes1-GR (HGR) comparado con su clona control GR. \*\*  $p < 0.0025$ . La barra representa 100  $\mu\text{m}$ .

## **7.5 La expresión del receptor a glucocorticoides humano, Hes1 y Msx1 son similares en las células transgénicas antes de la diferenciación.**

La integración de los plásmidos en las CTE es aleatoria, por lo tanto, se evaluaron los niveles de expresión del GR humano, el cual está incluido en todas las construcciones transgénicas. El cDNA se obtuvo de los cultivos de las células transgénicas que se mantuvieron en medio de cultivo con 2i/LIF. El cDNA de las CTE W9.5 se usó como control negativo. Después de la amplificación mediante qPCR no se observó amplicón en las W9.5, como se esperaba. Por otro lado, las líneas transgénicas expresaron el transgen, pero no se encontraron diferencias significativas, esto sugiere que las líneas expresan niveles comparables de los transgenes. **(Figura 14A)** Adicionalmente, para comparar los niveles endógenos de expresión de Hes1 y Msx1 en las células silvestres y las transgénicas, se hizo una PCR punto final a partir del cDNA de cultivos celulares que se mantuvieron en medio de cultivo con 2i/LIF. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de estos genes en condiciones no diferenciadas. **(Figura 14B)**

**A)****B)**

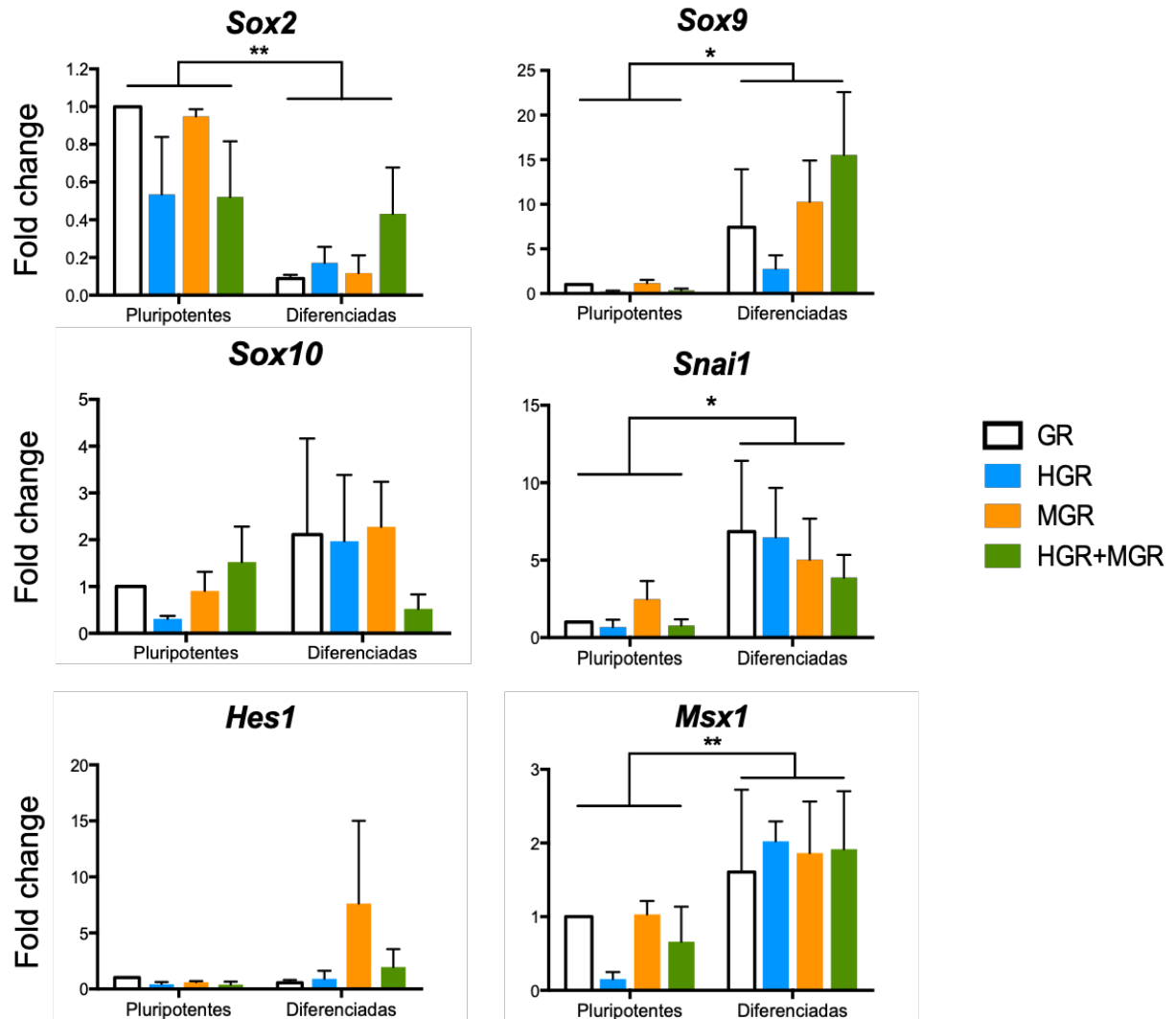
**Figura 14. RT-PCR para detectar el transgen del receptor a glucocorticoides humano y los niveles endógenos de Hes1 y Msx1 en células pluripotentes silvestres y líneas transgénicas.** Se obtuvo el RNA de las células W9.5, GR, HGR, MGR y HGR+MGR mantenidas con 2i/LIF. Para obtener el cDNA de cada una de las clonas, se extrajo el RNA y se realizó una reacción de retro-transcripción. Posteriormente se amplificó mediante qPCR **(A)** con oligonucleótidos específicos para el receptor a glucocorticoides humano (GR) mencionados en los métodos. Las células W9.5 no expresaron el transgen. La expresión de la secuencia transgénica presente en todos los plásmidos se normalizó con la expresión del gen endógeno  $\beta$ -actina. **B)** Se hizo una RT-PCR semi-cuantitativa para evaluar los transcritos de Hes1 y Msx1 en las células pluripotentes W9.5 (no transgénicas) y las células transgénicas (GR, HGR, MGR y HGR+MGR) cultivadas con 2i/LIF. Se muestra el promedio  $\pm$  SEM. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), se analizaron múltiples comparaciones y se aplicó la prueba de Tukey para evaluar diferencias

significativas. No se encontraron diferencias significativas entre las cuatro líneas transgénicas. Los resultados son el producto de 3-4 experimentos independientes.

## **7.6 Expresión de marcadores neurales y de cresta neural en las CTE antes y después de la diferenciación.**

Para evaluar la participación de *Hes1* y *Msx1* en la diferenciación neural a partir de las CTE, se utilizaron las células estromales PA6 como inductoras de la diferenciación neural. De acuerdo con lo publicado en el año 2000 por Kawasaki et al., al día 5 de inducción de la diferenciación neural, se obtienen precursores neurales positivos a Nestina.<sup>6</sup> También se ha reportado que la adición de BMP4 al día 5 de diferenciación, utilizando el mismo protocolo de inducción, compromete a las células a un destino de cresta neural.<sup>17</sup> Por lo anterior, las células transgénicas se co-cultivaron con las células PA6, al día 5 de diferenciación fueron estimuladas con 0.5 nM de BMP4 para obtener derivados de la cresta neural, después de 8 días de co-cultivo con las PA6, las células se cosecharon y se sembraron en placas cubiertas con fibronectina, se mantuvieron durante 48 horas en medio de diferenciación neural suplementado con extracto de embrión de pollo sin la adición de BMP4. La adición de la Dex para activar la translocación nuclear empezó desde el día 1 de diferenciación hasta el final del protocolo de diferenciación (Fig. 7). Al término del protocolo de diferenciación (10 días) se extrajo el RNA y se estandarizó la RT-PCR para analizar la expresión de diferentes marcadores de CN (**Figura 15**). En este ensayo, analizamos la expresión endógena de *Msx1* y *Hes1*, así como el marcador neural (*Sox2*) y los marcadores de CN (*Sox9*, *Sox10* y *Snai1*) después de diferenciación de CN sin la adición de Dex. Observamos diferencias significativas en la expresión de *Sox2*, *Sox9*, *Snai1* y *Msx1* cuando las CTE se sometieron al protocolo de diferenciación hacia derivados de CN. La expresión de *Sox2* disminuyó en las células diferenciadas y la expresión de *Sox9* y *Snai1* aumentó en todas las líneas transgénicas diferenciadas con respecto a las pluripotentes. Lo

anterior indica que el protocolo de diferenciación es adecuado para obtener derivados de la CN, ya que observamos un incremento en *Sox9* y *Snai1*, genes característicos de la CN.

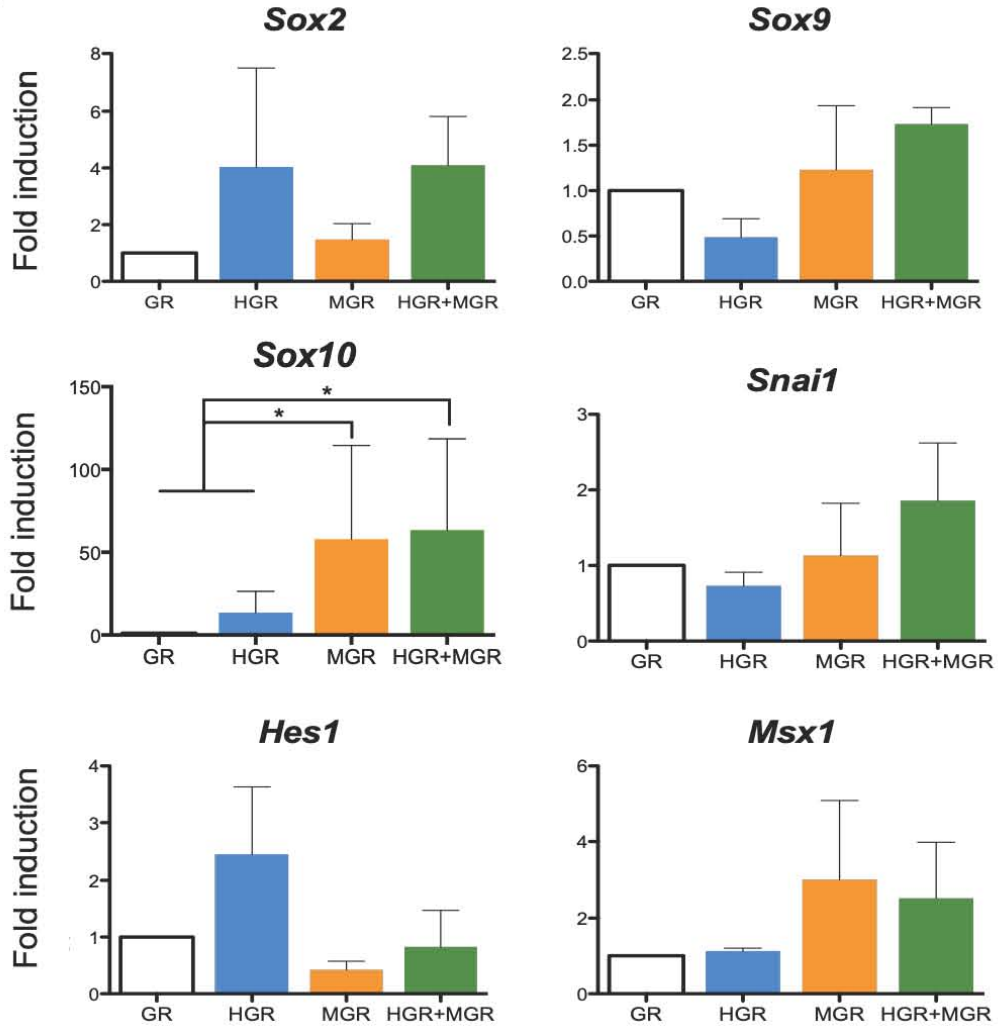


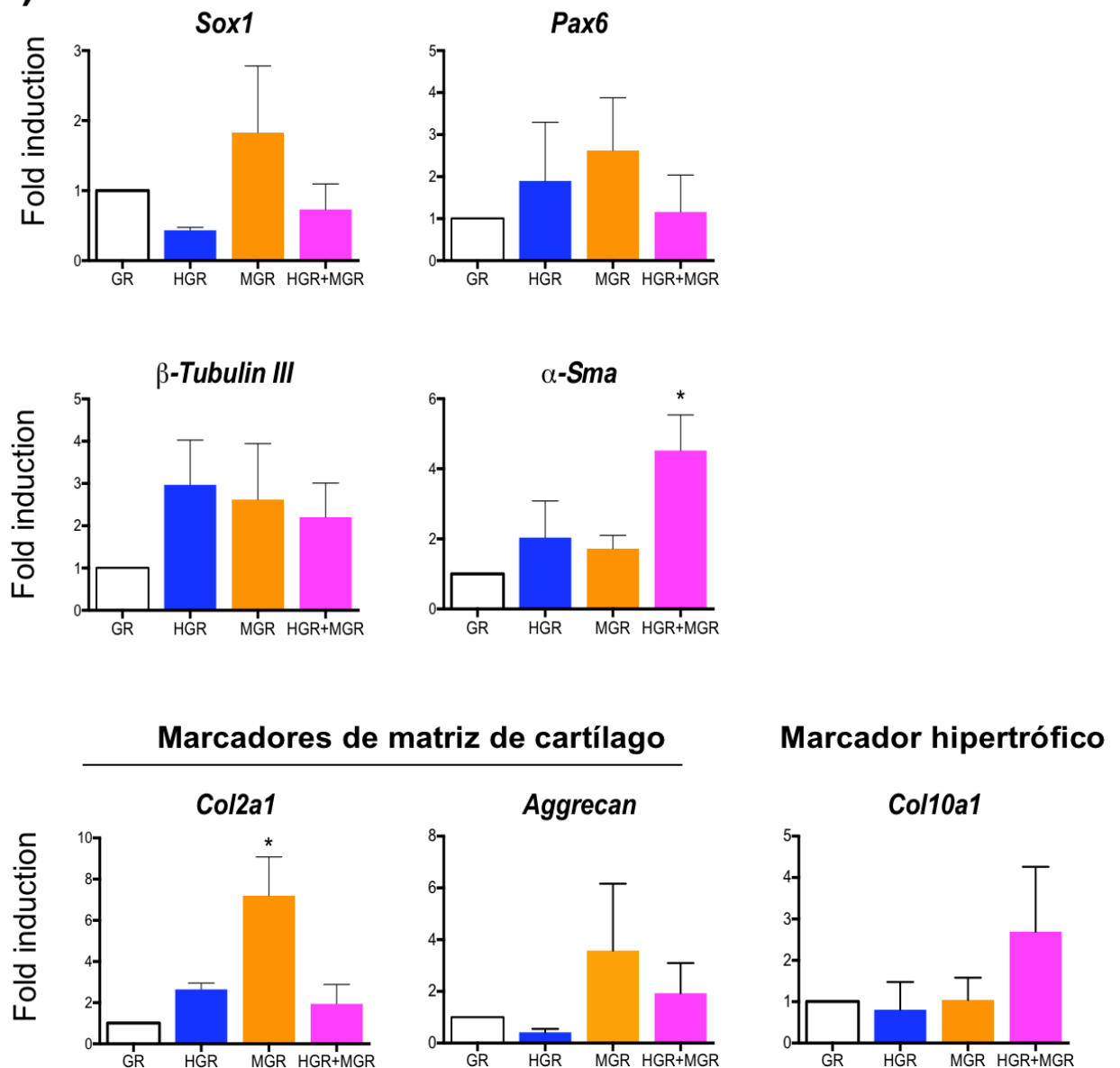
**Figura 15. Inducción de marcadores de cresta neural en células diferenciadas, en condiciones control.** Las células transgénicas pluripotenciales se diferenciaron hacia derivados de la cresta neural durante 10 días. La expresión de varios marcadores se evaluó mediante RT-PCR punto final. La expresión de cada gen se normalizó con su gen endógeno  $\beta$ -actina y las veces de cambio (fold change) fueron obtenidas mediante la normalización con los niveles encontrados en las GR pluripotentes. Se muestra el promedio  $\pm$  SEM. El análisis estadístico que se hizo fue un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de una comparación múltiple de Tukey. \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ .

Para evaluar la función de la activación de los transgenes HES1 y MSX1 durante el proceso de diferenciación, se agregó la Dex a una concentración de 10  $\mu$ M. Después de 10 días de diferenciación, las células se cosecharon y se extrajo el RNA. Se estandarizó la RT-PCR semi-cuantitativa para evaluar los marcadores de CN antes mencionados. La expresión de los diferentes genes se normalizó con respecto a su gen endógeno ( $\beta$ -actina) y posteriormente se obtuvieron las veces de cambio en la expresión del gen de interés en cada línea transgénica y se comparó con respecto a la expresión en GR, a lo que se le denominó veces de inducción (fold induction). De acuerdo con los resultados obtenidos, sólo observamos diferencias significativas en la expresión de *Sox10* de las líneas transgénicas con respecto a su control GR, después de diferenciación y la adición de Dex. **(Figura 16A)**

Con base en los resultados obtenidos, se decidió evaluar mediante RT-qPCR, la expresión de otros genes de diferenciación de derivados neurales y de la CN. Observamos que los genes relacionados a la diferenciación neural (*Pax6*, *Sox1* y  *$\beta$ -Tubulina III*), no mostraron cambios significativos en ninguna de las líneas transgénicas **(Figura 16B)**. Por otro lado, sólo observamos que en las células MGR diferenciadas, incrementó la expresión de Colágena tipo II, un marcador característico para condrocitos (*Col2a1*) **(Figura 16B)** y en las células doble-transgénicas (HGR+MGR), los transcritos de  *$\alpha$ -Sma* incrementaron después de la activación con Dex. Lo anterior sugiere que la activación de ambos factores transcripcionales incrementó la diferenciación a células de músculo liso, uno de los derivados de la CN **(Fig. 16B)**. Con base en lo que observamos en las células MGR, evaluamos la expresión de otros marcadores característicos de condrocitos, *Aggrecan* (marcador de matriz extracelular de condrocitos) y *Col10a1* (condrocitos hipertróficos), en los cuales no se observaron diferencias significativas. **(Figura 16B)**

A)



**B)**

**Figura 16.** La activación de la translocación nuclear de las proteínas quiméricas durante la diferenciación de las CTE en derivados de la CN incrementó los transcritos de *Col2a1* en células MGR (*Msx1-1GR*) y  *$\alpha$ -Sma* en las células dobles-transgénicas. Las células se diferenciaron a derivados de la cresta neural y se estimularon con 10  $\mu$ M de Dex para promover la translocación nuclear de las proteínas transgénicas. **A)** La RT-PCR punto final mostró diferencias significativas en la expresión de *Sox10* en células *Msx1-GR* y *Hes1-GR+Msx1-GR* con respecto a su control GR y *Hes1-GR* (HGR) después de la inducción de la translocación nuclear. **B)** Cuantificación de la expresión de marcadores

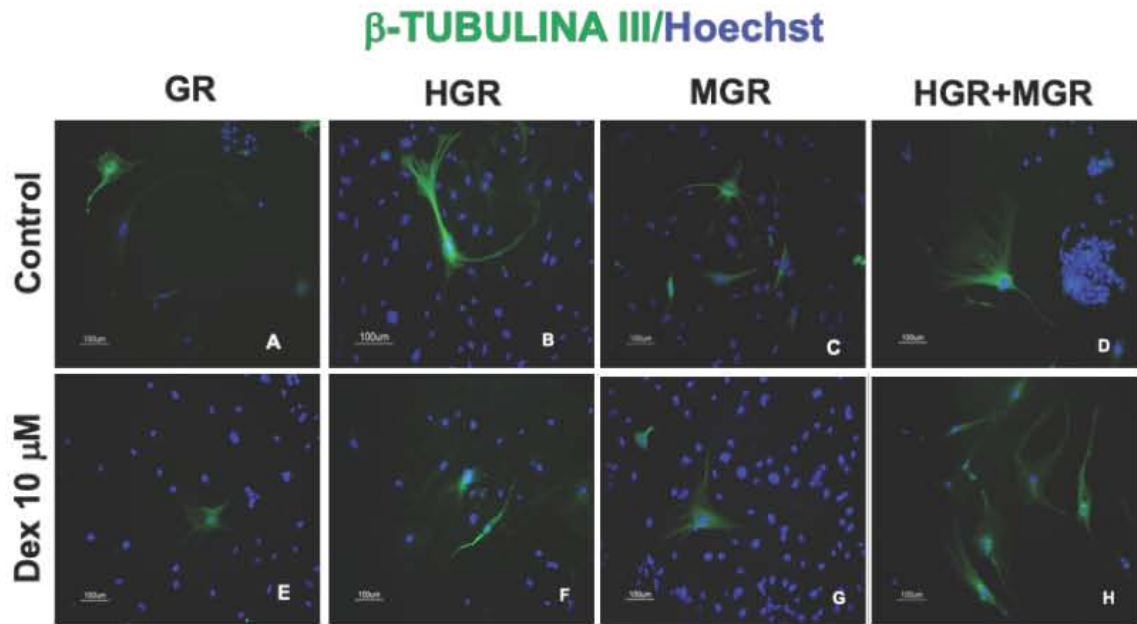
neurales y de la cresta neural mediante RT-qPCR. Las veces de inducción (fold induction) fue normalizada con respecto a los niveles en GR. Los datos de cada transcrito se normalizaron con respecto a los niveles de  $\beta$ -actina. Se muestra el promedio  $\pm$  SEM. Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y se hizo una comparación múltiple aplicando la prueba de Tukey. \* $p < 0.05$

## **7.7 La activación de HES1 y MSX1 incrementó las células positivas a $\beta$ -TUBULINA III y $\alpha$ -SMA.**

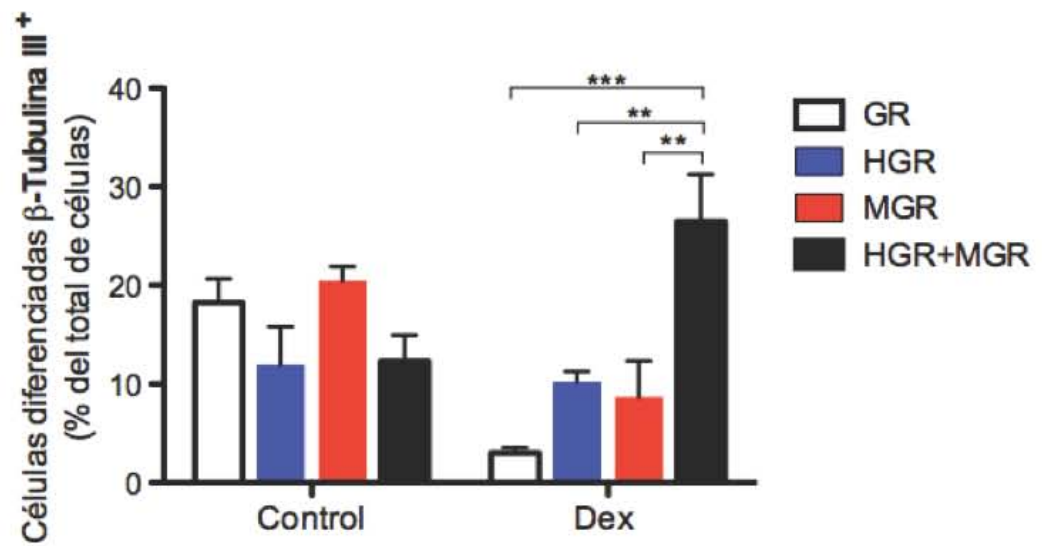
Las CTE transgénicas diferenciadas a derivados de la CN, se fijaron con PFA 4% al día 10 de diferenciación. Se evaluó la expresión de  $\beta$ -TUBULINA III y  $\alpha$ -SMA mediante inmunodetección con anticuerpos específicos. La expresión de  $\beta$ -TUBULINA III se observó en todas las condiciones (**Figura 17A**), sin embargo, al cuantificar el número de células positivas en cada condición, observamos que el número de células positivas para  $\beta$ -TUBULINA III incrementó significativamente cuando HES1 y MSX1 son activados simultáneamente con la Dex (**Figura 17B**). Anteriormente, demostramos en la RT-qPCR, que la estimulación de las células doble-transgénicas con Dex, incrementaba la expresión de la actina de músculo liso, por lo que la expresión de  $\alpha$ -SMA en las células diferenciadas se evaluó con anticuerpos específicos. Todas las condiciones, con y sin Dex presentaron células  $\alpha$ -SMA+ (**Figura 17C**); sin embargo, la cuantificación de las células inmunopositivas para este marcador mostraron un incremento significativo cuando HES1 y MSX1 (HGR+MGR) fueron activados con Dex (**Figura 17D**).

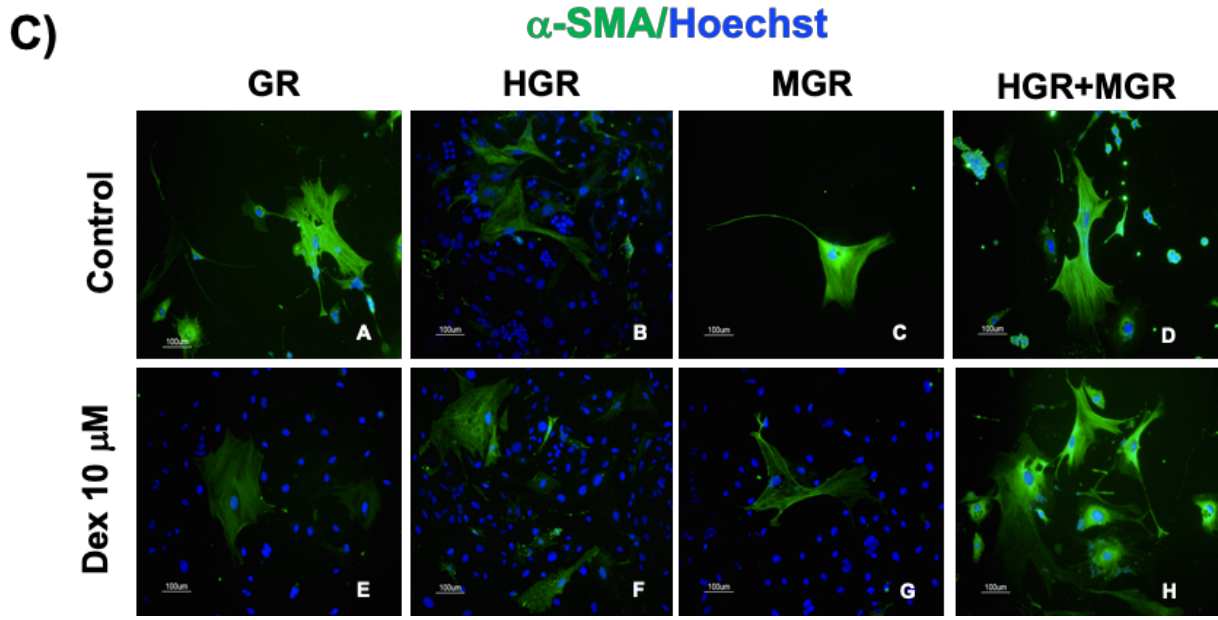


A)

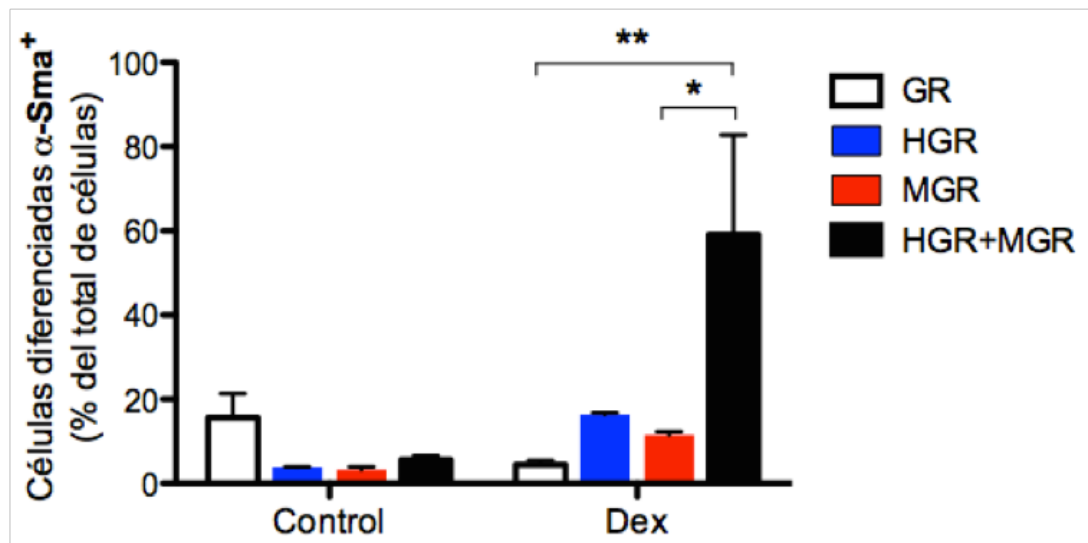


B)





**D)**



**Figura 17.** Activación de HGR (Hes1-GR) y MGR (Msx1-GR) con Dex en las células dobles transgénicas incrementó la diferenciación de células positivas para  $\beta$ -TUBULINA III y  $\alpha$ -SMA. Las células se diferenciaron en condiciones control y estimuladas con Dex 10  $\mu$ M durante 10 días. Se hicieron inmunotinciones con anti- $\beta$ -TUBULINA III (A) y  $\alpha$ -SMA (C). B) Cuantificación del número de células positivas para  $\beta$ -TUBULINA III después de 10 días de diferenciación. Las células doble-transgénicas promovieron un aumento en la proporción de neuronas comparada con GR, MGR y HGR. C)

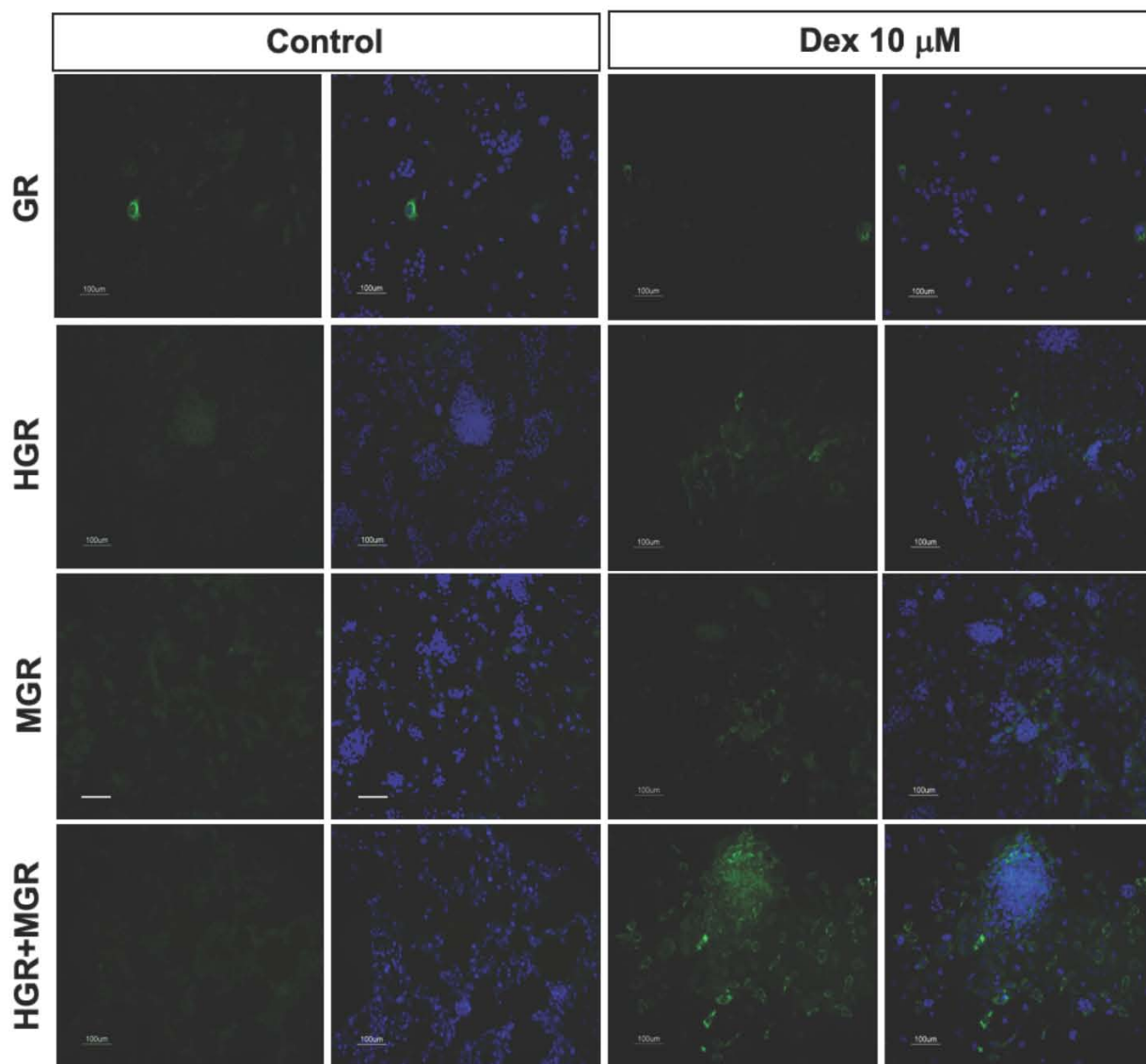
Inmunotinción con anti- $\alpha$ -SMA después de la diferenciación en condiciones control y estimuladas con Dex.

**D)** Cuantificación de las células positivas a  $\alpha$ -SMA con aspecto filamentoso. Las células doble-transgénicas produjeron una alta proporción de  $\alpha$ -SMA positivas cuando se compararon con el número de células en GR y MGR. Los experimentos se hicieron por triplicado; las imágenes se tomaron de al menos 10 campos diferentes de tres experimentos independientes. Se muestra el promedio  $\pm$  SEM. La prueba estadística que se aplicó fue un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación múltiple y se aplicó la prueba de Tukey. \* $p$ < 0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001. La barra representa 100  $\mu$ m.

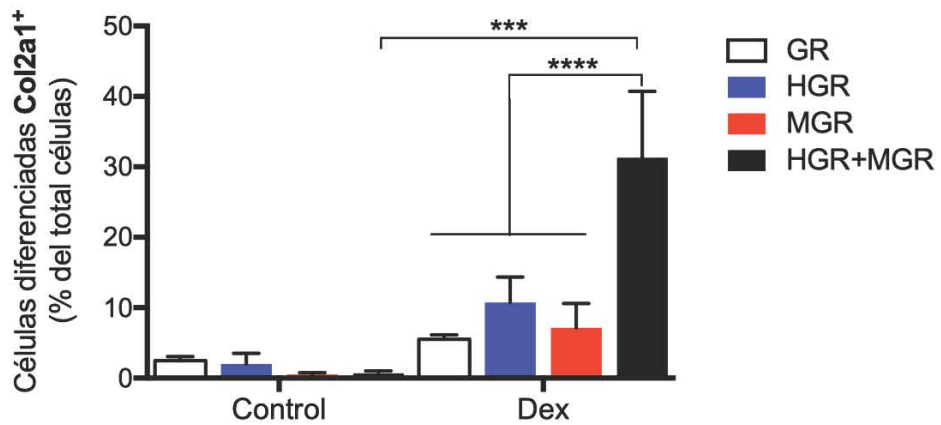
## **7.8 Las células MGR y dobles transgénicas incrementaron la diferenciación a condrocitos.**

Con base en los resultados obtenidos anteriormente (**Figura 16**), se evaluó la expresión proteínica de COL2A1 después del proceso de diferenciación a derivados de la CN antes descrito. Se realizó una inmunotinción de las células diferenciadas hacia CN en condiciones control y en condiciones en donde se activaron las construcciones con la Dex. La inmunotinción muestra que hay células positivas para COL2A1 cuando se activan las construcciones, sin embargo, sólo hubo un incremento significativo en el número de células positivas para COL2A1 en las células dobles transgénicas HGR+MGR después de la activación de ambos factores transcripcionales (**Figura 18**).

A) **COL2A1/Hoechst**

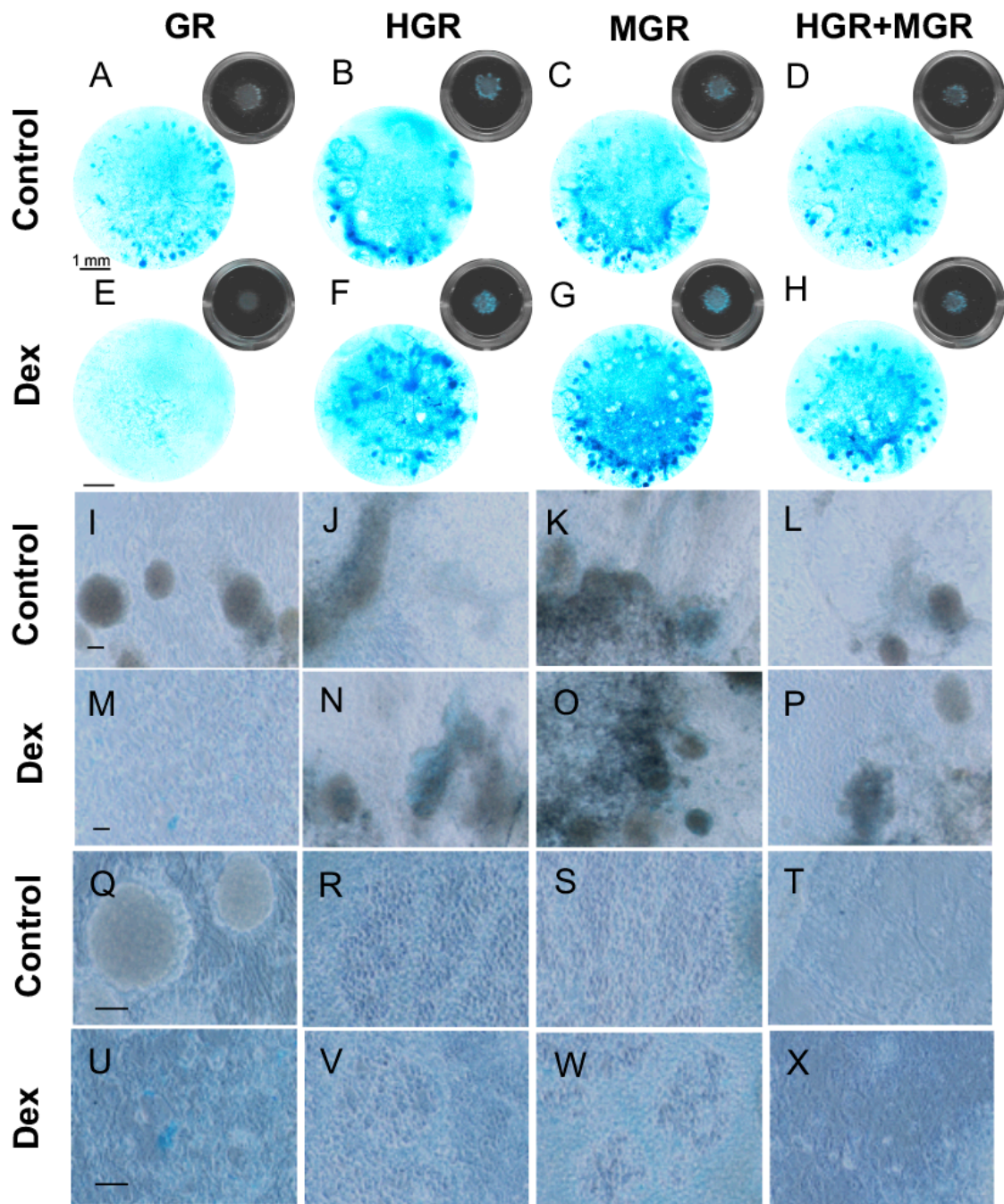


B)



**Figura 18. La activación de la translocación nuclear de HGR y MGR en las células doble transgénicas incrementó el número de células diferenciadas COL2A1<sup>+</sup>.** Las células se diferenciaron en condiciones control o con 10  $\mu$ M Dex durante 10 días y se realizó inmunodetección con el anticuerpo anti-COL2A1 (A). B) Cuantificación del número de células COL2A1<sup>+</sup>. Las células doble-transgénicas se diferenciaron en una alta proporción a condrocitos comparado con las células estimuladas con GR, MGR o HGR, así como las dobles transgénicas sin estimular. Se muestra el promedio  $\pm$  SEM. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y se realizaron múltiples comparaciones aplicando la prueba de Tukey. \*\*\* $p$ <0.001 y \*\*\*\* $p$ <0.0001. La barra representa 100  $\mu$ m.

Para corroborar mediante otro método la diferenciación condrogénica, las células transgénicas se co-cultivaron con las PA6 durante 8 días, como se indicó anteriormente. Al término de este tiempo, las células se cosecharon y se plaquearon para realizar cultivos en micromasas en medio de diferenciación para promover la diferenciación condrogénica (**Figura 7**).<sup>75</sup> Durante el proceso de diferenciación de los condrocitos, además de expresar marcadores como Sox9 y Col2a1, también expresan proteoglicanos como el aggrecan.<sup>76</sup> El Aggrecan puede ser un indicador de la formación de cartílago y se identifica mediante la tinción con la solución de azul alciano (La coloración azul está dada por la presencia de cobre en la solución). Para identificar a los proteoglicanos característicos de la matriz extracelular producida por los condrocitos, los cultivos en micromasas se tiñeron con azul alciano. Después de 3 días en cultivo en micromasas, no se observaron células positivas, aún después de la adición de Dex. Sin embargo, después de 10 días, todas las líneas mostraron una ligera tinción azul en ausencia de Dex, la activación de Msx1 incrementó la proporción de células positivas para el azul alciano. Se observaron agregados tipo piedras aplanadas en donde hubo más agregados en las células MGR estimuladas con Dex. (**Figura 19**)



**Figura 19. Activación de MSX1 incrementó la proporción de células positivas a Azul alciano de cultivos en micromasas.** Las CTE se diferenciaron usando las PA6 durante 8 días y se sembraron como agregados en cultivos de micromasas durante 10 días más. En condiciones control (A-D, I-L y Q-T), todas las líneas celulares mostraron poca tinción con Azul alciano en los agregados. La proporción de células azules incrementó después de la adición de Dex (E-H, M-P y U-X), principalmente en las células MGR (G, O y W). Los agregados celulares de color azul tipo “empedrado” sugieren la presencia de

condrocitos (R, S y W), las células largas quizá correspondan a condrocitos hipertróficos (T y X). La barra representa 1 mm (A-H), 500  $\mu\text{m}$  (I-P) y 100  $\mu\text{m}$  (Q-X).

## 8. DISCUSIÓN

En este trabajo, utilizamos las características del receptor a glucocorticoides humano (GR) como un sistema inducible para promover la translocación nuclear regulada de las proteínas transgénicas de HES1 y/o MSX1 fusionadas a GR. Se comprobó que HES1 y MSX1 fusionados a GR fueron responsivos a la adición de Dex, es decir que la adición de la Dex promovió la expresión de HES1 o MSX1 se encontró en el núcleo, esto se evaluó mediante inmunodetección. Se obtuvieron líneas transgénicas de CTE que contenían GR, HGR, MGR o HGR+MGR. La expresión de los marcadores de pluripotencia no se afectó por la expresión de los factores transcripcionales. Cada una de las células transgénicas respondió al protocolo de diferenciación hacia derivados de la CN. Después de la diferenciación de las células transgénicas para obtener derivados de la CN y la adición de Dex para inducir la translocación nuclear de los factores transcripcionales durante el progreso de la diferenciación, encontramos lo siguiente:

- 1) La translocación nuclear de HES1 y MSX1 en las células dobles-transgénicas incrementó significativamente la expresión de *Sox10*, así como la diferenciación hacia neuronas y células de músculo liso, aumentando el número de células positivas para  $\beta$ -TUBULINA III y actina de músculo liso, respectivamente.
- 2) Las células transgénicas con *MSX1* o *HES1+MSX1* mostraron un incremento en la diferenciación condrogénica evaluada por la expresión de *COL2A1*, la inmunotinción para *COL2A1* o la tinción con Azul alciano.

La familia de factores transcripcionales tipo bHLH, a la cual pertenece el factor transcripcional *Hes*, codifican proteínas nucleares que reprimen la transcripción de sus genes blanco. *Hes* tiene tres dominios conservados que confieren la función transcripcional: el dominio bHLH (dominio de unión al DNA y región de dimerización), dominio Orange (domino que selecciona el heterodímero bHLH) y el dominio WRPW (represor de la transcripción).<sup>77-79</sup> Se sabe que los genes *Hes* participan durante el desarrollo embrionario, participan en el mantenimiento de la población de



células progenitoras y en la regulación de la selección de destino celular. Durante el desarrollo neural tardío, HES-1 regula la selección de destino de los precursores gliales hacia la diferenciación astrocítica o hacia oligodendrocitos.<sup>80</sup> Por otro lado, los genes *Hes* también participan de manera muy importante en el ciclo celular<sup>36</sup>, así como también en la auto-renovación y la supervivencia celular de las células multipotentes neurales en el Sistema Nervioso Central.<sup>81</sup> Este factor transcripcional participa durante el desarrollo neural, pero su función en la inducción de la Cresta Neural de mamíferos aún no está clara. En este trabajo, no observamos una diferencia significativa en la diferenciación de CN en las células HGR estimuladas con Dex.

Se reportó que HES-1 incrementa la actividad del promotor de  $\alpha$ -*Sma* en células hepáticas estelares,<sup>82</sup> trabajos previos reportaron que la activación yuxtacrina de *Hes1* por la vía de señalización de Notch no incrementó los niveles de proteína en el mismo tipo celular.<sup>83</sup> En contraste, los niveles altos de expresión de *Hes1* inhiben la capacidad de MYOD para convertir los fibroblastos embrionarios de ratón C3H10T1/2 a células musculares.<sup>35</sup> Nuestros resultados muestran que la activación de HGR y MGR individualmente no induce más transcritos de  $\alpha$ -*Sma* ni proteína. Sin embargo, la co-activación dada por la Dex en las células HGR+MGR mostraron un efecto significativo, incrementando tanto las células positivas para  $\alpha$ -SMA como su mRNA. Interesantemente, un trabajo demostró que las células de la CN obtenidas a partir de células pluripotentes inducidas humanas produjeron células de músculo liso, que expresaron  $\alpha$ -*Sma*, después de la diferenciación en presencia de TGF $\beta$ -1.<sup>84</sup> Por lo anterior, la regulación de la expresión de  $\alpha$ -*Sma* es dependiente de los heterodímeros que se formen con *Hes1* y/o del tipo celular.

Por otro lado, se reportó que los genes *Msx*, participan en la proliferación, diferenciación e inducción de la CN, durante el desarrollo embrionario. MSX1 y MSX2 se requieren específicamente para la osteogénesis a partir del linaje de la CN craneal. Se demostró que la

expresión de *Msx1* en las células de la CN craneal es muy alta y también se observó que este factor transcripcional participa en la regulación de la transición epitelio a mesénquima (EMT; por sus siglas en inglés epithelium mesenchyma transition) durante la organogénesis.<sup>85,86</sup> *Msx1* y *Msx2* funcionan de una manera redundante en diversos tejidos y órganos durante el desarrollo de los vertebrados, incluyendo el corazón. Los ratones dobles Knock-out (KO) para *Msx1*<sup>-/-</sup> y *Msx2*<sup>-/-</sup> tienen múltiples defectos en el tracto de salida cardiaca. Estos defectos están asociados con una excesiva proliferación de la CN cardiaca.<sup>60</sup> En un estudio, en donde usaron ratones nulos para *Msx1/Msx2* analizaron el efecto de la ausencia de estos genes durante el desarrollo de las válvulas y las almohadillas atrio-ventriculares del corazón. Demostraron que los ratones mutantes tuvieron una EMT alterada resultando en almohadillas hipoplásicas y malformación de las válvulas. Interesantemente,  $\alpha$ -*Sma* está expresado antes de la EMT en los precursores de músculo liso y se reportó que en los ratones doble KO, la expresión de  $\alpha$ -*Sma* disminuyó. Lo anterior indica que  $\alpha$ -*Sma* contribuye a la deficiencia en la formación de las almohadillas atrio-ventriculares.<sup>87</sup> La CN es la principal fuente de células de músculo liso en los vasos sanguíneos (por ejemplo, la aorta, los conductos arteriosos, carótida común, innominada y arteria subclavia derecha).<sup>88-91</sup> Todos estos resultados y la evidencia previamente mostrada sugieren que la activación simultánea de MSX1 y HES1 participan en la regulación de la expresión de  $\alpha$ -*Sma*.

Las proteínas SOX son candidatas para participar en la especificación de la CN. Estas proteínas se involucran en varios procesos durante la embriogénesis. Con base en la secuencia de aminoácidos de los dominios HMG, las proteínas SOX se dividen en diez grupos (A-H). El grupo E consiste de tres miembros (*Sox8*, *Sox9* y *Sox10*), los cuales se expresan en varios tejidos en desarrollo, incluyendo la CN.<sup>92</sup> *Sox9* es un marcador temprano de la CN prospectiva, el cual precede a los marcadores de las células migratorias. *Sox9* es el primero que se expresa y su expresión se superpone con la expresión de BMP4 y *Snai2*.<sup>93,94</sup> *Sox10* se expresa poco tiempo después de *Snai2* y se observó que se necesita tanto para la supervivencia temprana y migración de la CN, así como para la diferenciación de las células de Schwann y los melanocitos. La

expresión de *Sox10* continúa durante el desarrollo de la glía, pero está disminuida en otros linajes de la CN.<sup>95</sup>

*In vivo*, las células de la cresta neural constituyen una población transitoria que surge del ectodermo y migra a través del organismo para diferenciarse a diversos tipos celulares. Un trabajo, describió que las CT multipotentes de la CN se aislan del nervio ciático<sup>74</sup> o de las células pos-migratorias del primer arco branquial en el ratón;<sup>96</sup> estas células se diferencian, bajo condiciones *in vitro*, a neuronas, osteoblastos, miofibroblastos (positivas para  $\alpha$ -SMA) y células de Schwann. Esto sugiere que un nicho de CT de CN estaría presente *in vivo*, sin embargo, las células cultivadas *in vitro* presentan un comportamiento diferente en términos de expresión de genes de progenitores y diferenciación terminal dado por las condiciones micro-ambientales y pureza de la población. Con base en lo anterior, las “crestoesferas” multipotentes de embriones de pollo, expresan los genes de CN *Sox9*, *Ets1*, *Bmp4* y *Snai2*, así como el marcador neural *Pax6*.<sup>97</sup> Estas células de la CN se diferenciaron a neuronas, melanocitos, células de músculo liso y condrocitos, tanto *in vivo* como después del trasplante en la mesénquima de la cabeza de pollos. La inducción de la población de la CN pre-migratoria a partir de rosetas neurales derivadas de CTE humanas promovió la formación de crestoesferas que se diferenciaron a neuronas, melanoblastos, células de músculo liso y condrocitos, pero en co-cultivo con neuroesferas obteniéndose células positivas para *Sox2*. Estos resultados muestran las diferencias cuando se estudian a los progenitores de la CN y estos se diferencian *in vitro* a partir de las CTE. Nosotros observamos un incremento estadísticamente significativo en la expresión de *Sox9* y *Snai1* después de la inducción de la CN sin la adición de la Dex, indicando que hubo una inducción apropiada de la CN a partir de las CTE.

Por otro lado, las células MGR y HGR+MGR estimuladas con Dex, incrementaron la expresión de *Sox10* de manera significativa. Esto sugiere que el estado progenitor de la CN está enriquecido bajo estas condiciones. Sin embargo, también observamos que hubo un incremento

en la diferenciación hacia neuronas, células de músculo liso y células tipo condrocitos, lo cual indica que hay diversas poblaciones celulares en diferentes estados de diferenciación de las células de la CN. Este es el primer reporte que indica que la activación de HES-1 y MSX-1 en CTE promueve una alta proporción de neuronas, células de músculo liso y condrocitos, derivados obtenidos de la diferenciación de CT a CN así como de progenitores de la CN, sin embargo los mecanismos aún no se han identificado.

Algunos trabajos han demostrado que los morfógenos como las BMP's, junto con el factor de transcripción SOX9, son cruciales para la condrogénesis. Sox9 es un factor transcripción que especifica el linaje condrogénico a través de la activación de la Colágena Ila (*Col2a1*).<sup>98</sup> Un ratón Knock-out condicional para Sox9 bajo el promotor de Wnt1 mostró defectos en la producción de cartílago en las estructuras craneales.<sup>99</sup> Por otro lado, se demostró que *Col2a1* se regula por BARX2, un factor transcripcional que pertenece a la familia de factores transcripcionales con Homeodominio, familia a la que pertenece Msx1.<sup>100</sup> Los condrocitos son articulares o de crecimiento en placa (hipertróficos): los primeros dan origen al cartílago y los hipertróficos proporcionan una plataforma en donde el hueso se formará, sustituyendo a las células hipertróficas. Los condrocitos hipertróficos expresan *Col10a1*.<sup>101</sup>

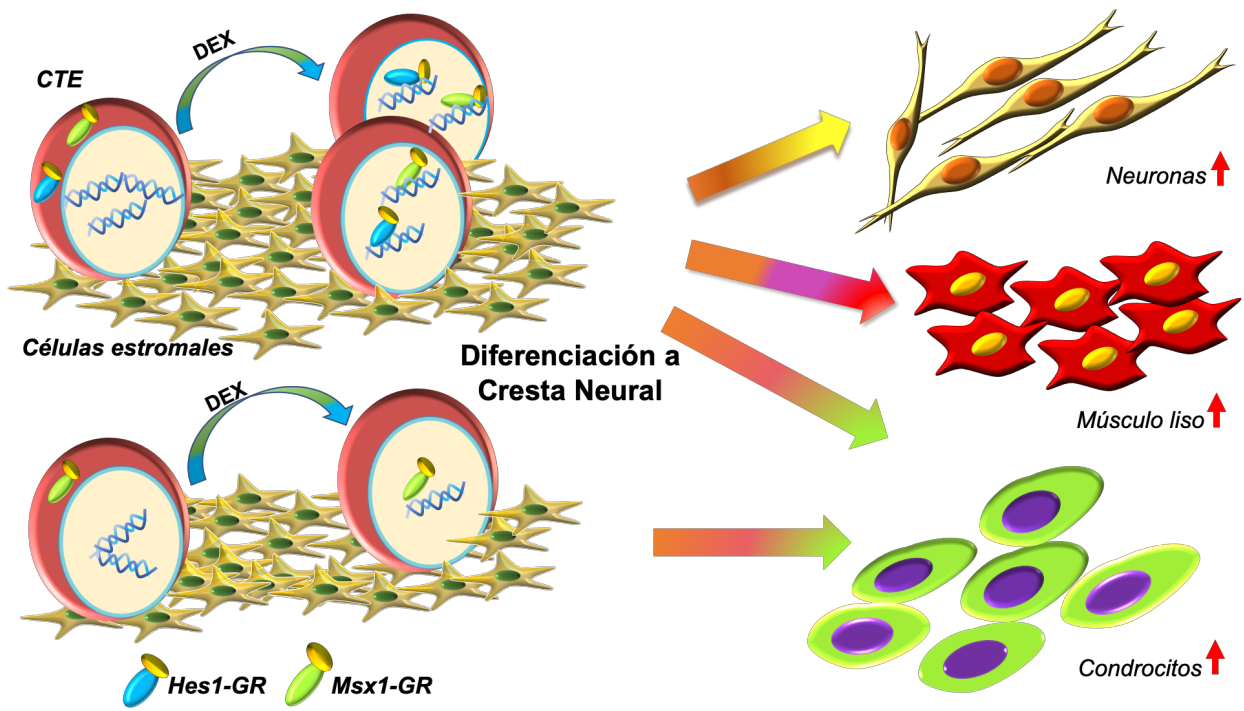
La activación de los genes Msx por la vía de señalización de BMP promueven el desarrollo del cartílago. Por ejemplo, la adición de BMP-7 exógeno a la región lateral de la mandíbula en un estadio temprano de desarrollo provocó la expresión ectópica de Msx1 e inhibió la formación del cartílago de Meckel. Sin embargo, la adición de BMP-7 en estadios tardíos incrementó la expresión de Msx1, promoviendo un incremento en la condrogénesis.<sup>102</sup>

Encontramos que la activación de MSX-1 en las células MGR indujo una mayor expresión de la transcripción de *Col2a1*, así como un incremento en la tinción con Azul alciano en los cultivos en micromasas, un efecto que no se reportó anteriormente pero que podría tener implicaciones interesantes en el desarrollo del cartílago. Por lo tanto, la expresión de *Col2a1* es un indicativo

de la maduración de condrocitos de células diferenciadas a partir de CTE de ratón y se observó utilizando un protocolo diferente, que involucró la formación de cuerpos embrionarios y agregación celular, para producir condrocitos.<sup>103</sup> Craft y colaboradores utilizaron un protocolo diferente de inducción para la producción de condrocitos articulares o hipertróficos. Ellos describieron diferencias en la morfología y los niveles de proteína de COLAGENA2A1: las células hipertróficas son largas y tuvieron altos niveles de *Col2*, comparado con las células articulares<sup>103</sup>. Nuestros resultados indicaron que en las células MGR estimuladas con Dex, ocurrió la condrogénesis, evaluado por la expresión de *Sox9* y *Col2a1*. Además, las células MGR estimuladas con Dex y resembradas en condiciones de micromasas, mostraron una fuerte tinción para componentes de la matriz extracelular detectado por Azul alciano. Interesantemente, las células HGR+MGR estimuladas con Dex mostraron un incremento en las proporciones de células positivas para COL2A1, células largas tipo condrocitos y un incremento, aunque no estadísticamente significativo, de la expresión del marcador hipertrófico *Col10a1*, sugiriendo que la activación simultánea de HES1 y MSX1 promueve el crecimiento tipo “aplanado” con un fenotipo de condrocitos.

## 9. CONCLUSIÓN

En conjunto, nuestros resultados muestran que la activación simultánea de dos genes clave, que previamente se estudiaron durante el desarrollo embrionario de diferentes organismos como en pollo, ratón y rana, también tienen un efecto en la diferenciación de CTE de ratón hacia la CN. Se describieron diversos protocolos para la diferenciación de CTE hacia derivados de la CN, los cuales requieren de diversas moléculas exógenas para la regulación de diversas vías de señalización requeridas para facilitar la diferenciación hacia derivados de la CN<sup>104</sup>. Cabe señalar que, en este trabajo, los linajes que se obtuvieron son producto de la diferenciación de las CTE a través de la activación de los factores transcripcionales HES1 y MSX1 y la estimulación extracelular. Los resultados obtenidos nos permiten suponer que las células que expresan  $\alpha$ -Sma pueden ser utilizadas como un modelo *in vitro* para poder elucidar los genes y vías de señalización involucradas en la obtención de células de músculo liso para la investigación en el desarrollo vascular, así como en las enfermedades. Las células de músculo liso vasculares son derivados de la CN, una población importante en los procesos fisiológicos y patológicos que no están completamente comprendidos (por ejemplo las neurocristopatías CADASIL y los síndromes de Alagille).<sup>105</sup> Por otro lado, las células MGR podrían ser usadas para producir condrocitos con una alta eficiencia. Esta población es derivada de la CN y es muy importante para el desarrollo craneofacial. Finalmente, nosotros observamos que no hubo una participación sinérgica de HES1 y MSX1, después de su activación, en la expresión de marcadores tempranos de diferenciación (*Sox9*, *Sox10*, *Snai1* y *Msx1*) de las CCN. Sin embargo, la activación simultánea de HES1 y MSX1 incrementó de manera sinérgica la expresión de genes de diferenciación tardía, es decir en la expresión de transcritos y proteína de  $\alpha$ -SMA, así como de  $\beta$ -TUBULINA III Y COL2A1.



**Figura 20. Esquema de la participación de HES1 y MSX1 en la diferenciación de CTE de ratón hacia derivados de la CN.** La adición de Dex a las CTE transgénicas provocó la translocación de HES1 y MSX1. La inducción de la diferenciación hacia derivados de la CN mediante la actividad inductora de las células PA6 y el BMP4, incrementó el número de neuronas  $\beta$ -TUBULINA III<sup>+</sup>, células musculares  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> y condrocitos COL2A1<sup>+</sup> con respecto a su versión control. Por otro lado, la translocación de MSX1 incrementó el número de células que incorporaron el azul alciano, indicativo de condrocitos en estado mas avanzado de diferenciación.

## REFERENCIAS

1. Pelayo, R., Santa-Olalla Jesús & Velasco Iván. *Células troncales y medicina regenerativa*. (UNAM, PUIS, 2011).
2. Ying, Q.-L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–523 (2008).
3. Nichols, J. *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* (1998). doi:10.1016/S0092-8674(00)81769-9
4. Chambers, I. *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* (2003). doi:10.1016/S0092-8674(03)00392-1
5. Avilion, A. A. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* (2003). doi:10.1101/gad.224503
6. Kawasaki, H. *et al.* Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28**, 31–40 (2000).
7. Le Douarin, N. M. & Dupin, E. Multipotentiality of the neural crest. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 529–536 (2003).
8. Vega-Lopez, G. A., Cerrizuela, S. & Aybar, M. J. Trunk neural crest cells: formation, migration and beyond. *Int. J. Dev. Biol.* **61**, 5–15 (2017).
9. Simões-Costa, M. & Bronner, M. E. Insights into neural crest development and evolution from genomic analysis. *Genome Res.* **23**, 1069–1080 (2013).
10. Bronner, M. E. & LeDouarin, N. M. Development and evolution of the neural crest: An overview. *Developmental Biology* **366**, 2–9 (2012).
11. Mayor, R. & Theveneau, E. The neural crest. *Development* **140**, 2247–51 (2013).



12. Sauka-Spengler, T. & Bronner-Fraser, M. Development and evolution of the migratory neural crest: a gene regulatory perspective. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 360–366 (2006).
13. Knecht, A. K. & Bronner-Fraser, M. Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 453–461 (2002).
14. Basch, M. L., Bronner-Fraser, M. & García-Castro, M. I. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature* **441**, 218–22 (2006).
15. Bain, G., Ray, W. J., Yao, M. & Gottlieb, D. I. Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* **223**, 691–694 (1996).
16. Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, a. C., Segal, M. & McKay, R. D. G. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech. Dev.* **59**, 89–102 (1996).
17. Mizuseki, K. *et al.* Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5828–5833 (2003).
18. Leung, A. W. *et al.* WNT/ -catenin signaling mediates human neural crest induction via a pre-neural border intermediate. *Development* **143**, 398–410 (2016).
19. Noisa, P., Lund, C., Kanduri, K., Lund, R. & La, H. Notch signaling regulates the differentiation of neural crest from human pluripotent stem cells. *J. Cell Sci.* **127**, 2083–2094 (2014).
20. Aybar, M. J., Glavic, A. & Mayor, R. Extracellular signals, cell interactions and transcription factors involved in the induction of the neural crest cells. *Biol Res* **35**, 267–275 (2002).

21. Aybar, M. J. & Mayor, R. Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 452–458 (2002).
22. Barembaum, M. & Bronner-Fraser, M. Early steps in neural crest specification. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 642–646 (2005).
23. LaBonne, C. & Bronner-Fraser, M. Induction and patterning of the neural crest, a stem cell-like precursor population. *J. Neurobiol.* **36**, 175–189 (1998).
24. Aybar, M. J., Nieto, M. A. & Mayor, R. Snail precedes slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the *Xenopus* neural crest. *Development* **130**, 483–494 (2003).
25. Sasai, N., Mizuseki, K. & Sasai, Y. Requirement of FoxD3-class signaling for neural crest determination in *Xenopus*. *Development* **128**, 2525–2536 (2001).
26. Teng, L., Mundell, N. a, Frist, A. Y., Wang, Q. & Labosky, P. a. Requirement for Foxd3 in the maintenance of neural crest progenitors. *Development* **135**, 1615–1624 (2008).
27. Tribulo, C., Aybar, M. J., Nguyen, V. H., Mullins, M. C. & Mayor, R. Regulation of Msx genes by a Bmp gradient is essential for neural crest specification. *Development* **130**, 6441–6452 (2003).
28. Spokony, R. F., Aoki, Y., Saint-Germain, N., Magner-Fink, E. & Saint-Jeannet, J.-P. The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. *Development* **129**, 421–432 (2002).
29. Honoré, S. M., Aybar, M. J. & Mayor, R. Sox10 is required for the early development of the prospective neural crest in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* **260**, 79–96 (2003).
30. Bonano, M. *et al.* A new role for the Endothelin-1/Endothelin-A receptor signaling during early neural crest specification. *Dev Biol* **323**, 114–129 (2008).

31. Vega-López, G. A. *et al.* Functional analysis of Hairy genes in *Xenopus* neural crest initial specification and cell migration. *Dev. Dyn.* **244**, 988–1013 (2015).
32. Kageyama, R. & Ohtsuka, T. The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Res* **9**, 179–188 (1999).
33. Akazawa, C., Sasai, Y., Nakanishi, S. & Kageyama, R. Molecular characterization of a rat negative regulator with a basic helix-loop-helix structure predominantly expressed in the developing nervous system. *J. Biol. Chem.* **267**, 21879–21885 (1992).
34. Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I. & Caudy, M. Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev.* **8**, 2743–2755 (1994).
35. Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R. & Nakanishi, S. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev.* **6**, 2620–2634 (1992).
36. Kageyama, R., Ohtsuka, T. & Kobayashi, T. The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* **134**, 1243–1251 (2007).
37. Nichane, M., Ren, X., Souopgui, J. & Bellefroid, E. J. Hairy2 functions through both DNA-binding and non DNA-binding mechanisms at the neural plate border in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **322**, 368–380 (2008).
38. Ishibashi, M. *et al.* Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev.* **9**, 3136–3148 (1995).
39. Hatakeyama, J., Sakamoto, S. & Kageyama, R. Hes1 and Hes5 regulate the development of the cranial and spinal nerve systems. *Dev. Neurosci.* **28**, 92–101 (2006).

40. Akimoto, M. *et al.* Hes1 is required for the development of craniofacial structures derived from ectomesenchymal neural crest cells. *J. Craniofac. Surg.* **21**, 1443–9 (2010).
41. Perdigoto, C. N. & Bardin, A. J. Sending the right signal: Notch and stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1830**, 2307–2322 (2013).
42. Mumm, J. S. *et al.* A Ligand-Induced Extracellular Cleavage Regulates  $\gamma$ -Secretase-like Proteolytic Activation of Notch1. *Mol. Cell* **5**, 197–206 (2000).
43. Kageyama, R., Ohtsuka, T. & Tomita, K. The bHLH gene Hes1 regulates differentiation of multiple cell types. *Mol. Cells* **10**, 1–7 (2000).
44. Shimojo, H., Ohtsuka, T. & Kageyama, R. Dynamic Expression of Notch Signaling Genes in Neural Stem/Progenitor Cells. *Front. Neurosci.* **5**, (2011).
45. Kobayashi, T. *et al.* The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes Dev.* **23**, 1870–1875 (2009).
46. Sturrock, M., Hellander, A., Matzavinos, A. & Chaplain, M. A. J. Spatial stochastic modelling of the Hes1 gene regulatory network: intrinsic noise can explain heterogeneity in embryonic stem cell differentiation. *J. R. Soc. Interface* **10**, 20120988 (2013).
47. Bendall, A. J. & Abate-Shen, C. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene* **247**, 17–31 (2000).
48. Bendall, a J., Ding, J., Hu, G., Shen, M. M. & Abate-Shen, C. Msx1 antagonizes the myogenic activity of Pax3 in migrating limb muscle precursors. *Development* **126**, 4965–4976 (1999).
49. Wang, J. & Abate-Shen, C. Transcriptional repression by the Msx1 homeoprotein is associated with global redistribution of the H3K27me3 repressive mark to the nuclear periphery. *Nucleus* **3**, 155–61 (2012).

50. Woloshin, P. *et al.* MSX1 inhibits MyoD expression in fibroblast × 10T 1/2 cell hybrids. *Cell* **82**, 611–620 (1995).
51. Liu, Y. H. *et al.* Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: A possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Dev. Biol.* **205**, 260–274 (1999).
52. Odelberg, S. J., Kollhoff, A. & Keating, M. T. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell* **103**, 1099–1109 (2000).
53. Hu, G., Lee, H., Price, S. M., Shen, M. M. & Abate-Shen, C. Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1. *Development* **128**, 2373–84 (2001).
54. Han, J. *et al.* Cranial neural crest-derived mesenchymal proliferation is regulated by Msx1-mediated p19INK4d expression during odontogenesis. *Dev. Biol.* **261**, 183–196 (2003).
55. Ishii, M. Msx2 and Twist cooperatively control the development of the neural crest-derived skeletogenic mesenchyme of the murine skull vault. *Development* **130**, 6131–6142 (2003).
56. Marazzi, G., Wang, Y. & Sassoon, D. Msx2 is a transcriptional regulator in the BMP4-mediated programmed cell death pathway. *Dev. Biol.* **186**, 127–138 (1997).
57. Ekker, M. *et al.* Relationships among msx gene structure and function in zebrafish and other vertebrates. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 1008–1022 (1997).
58. Davidson, D. The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes. *Trends in Genetics* **11**, 405–411 (1995).
59. Ichiro, S. & Richard, M. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature* **7**, 362–369 (1994).

60. Ishii, M. Combined deficiencies of Msx1 and Msx2 cause impaired patterning and survival of the cranial neural crest. *Development* **132**, 4937–4950 (2005).
61. Song, K., Wang, Y. & Sassoon, D. Expression of Hox-7.1 in myoblasts inhibits terminal differentiation and induces cell transformation. *Nature* **360**, 477–481 (1992).
62. Catron, K. M. *et al.* Transcriptional repression by Msx-1 does not require homeodomain DNA-binding sites. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 861–871 (1995).
63. Zhang, H., Catron, K. M. & Abate-Shen, C. A role for the Msx-1 homeodomain in transcriptional regulation: residues in the N-terminal arm mediate TATA binding protein interaction and transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1764–1769 (1996).
64. Gonzalez, S. M., Ferland, L. H., Robert, B. & Abdelhay, E. Structural and functional analysis of mouse Msx1 gene promoter: sequence conservation with human MSX1 promoter points at potential regulatory elements. *DNA Cell Biol* **17**, 561–572 (1998).
65. Jones, C. M., Lyons, K. M. & Hogan, B. L. Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development* **111**, 531–542 (1991).
66. Lyons, K. M., Hogan, B. L. M. & Robertson, E. J. Colocalization of BMP 7 and BMP 2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech. Dev.* **50**, 71–83 (1995).
67. Alvarez Martinez, C. E. *et al.* Characterization of a smad motif similar to drosophila mad in the mouse Msx 1 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 655–662 (2002).
68. MEHRA-CHAUDHARY, R., MATSUI, H. & RAGHOW, R. Msx3 protein recruits histone deacetylase to down-regulate the Msx1 promoter. *Biochem. J.* **353**, 13 (2000).

69. Binato, R., Alvarez Martinez, C. E., Pizzatti, L., Robert, B. & Abdelhay, E. SMAD 8 binding to mice Msx1 basal promoter is required for transcriptional activation. *Biochem. J.* **393**, 141–50 (2006).
70. Oakley, R. H. & Cidlowski, J. A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: New mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 3177–3184 (2011).
71. Novotna, A., Pavek, P. & Dvorak, Z. Construction and characterization of a reporter gene cell line for assessment of human glucocorticoid receptor activation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **47**, 842–7 (2012).
72. Jameson, J. L. & Hollenberg, A. N. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr. Rev.* **14**, 203–221 (1993).
73. Kolm, P. J. & Sive, H. L. Efficient hormone-inducible protein function in *Xenopus laevis*. *Developmental biology* **171**, 267–272 (1995).
74. Morrison, S. J., White, P. M., Zock, C. & Anderson, D. J. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* **96**, 737–749 (1999).
75. Chimal-Monroy, J. *et al.* Comparative analysis of the expression and regulation of Wnt5a, Fz4, and Frzb1 during digit formation and in micromass cultures. *Dev. Dyn.* (2002). doi:10.1002/dvdy.10110
76. Gentili/snm, C., > & Cancedda, R. Cartilage and Bone Extracellular Matrix. *Curr. Pharm. Des.* (2009). doi:10.2174/138161209787846739
77. Dawson, S. R., Turner, D. L., Weintraub, H. & Parkhurst, S. M. Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH

- domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6923–6931 (1995).
78. Taelman, V. *et al.* Sequences downstream of the bHLH domain of the *Xenopus* hairy-related transcription factor-1 act as an extended dimerization domain that contributes to the selection of the partners. *Dev. Biol.* **276**, 47–63 (2004).
  79. Seon, A. K., Jea, H. S. & Kim, J. The conserved WRPW motif of Hes6 mediates proteasomal degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 33–36 (2005).
  80. Wu, Y., Liu, Y., Levine, E. M. & Rao, M. S. Hes1 but not Hes5 regulates an astrocyte versus oligodendrocyte fate choice in glial restricted precursors. *Dev. Dyn.* **226**, 675–689 (2003).
  81. Nichane, M., Ren, X. & Bellefroid, E. J. Self-regulation of Stat3 activity coordinates cell-cycle progression and neural crest specification. *EMBO J.* **29**, 55–67 (2009).
  82. Zhang, K. *et al.* Hes1, an important gene for activation of hepatic stellate cells, is regulated by Notch1 and TGF-beta/BMP signaling. *World J Gastroenterol* **21**, 878–887 (2015).
  83. Chen, S. *et al.* Activation of Notch1 signaling by marrow-derived mesenchymal stem cells through cell-cell contact inhibits proliferation of hepatic stellate cells. *Life Sci.* **89**, 975–981 (2011).
  84. Wang, A. *et al.* Derivation of Smooth Muscle Cells with Neural Crest Origin from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells Tissues Organs* **195**, 5–14 (2012).
  85. Robert, B., Sassoon, D., Jacq, B., Gehring, W. & Buckingham, M. Hox-7, a mouse homeobox gene with a novel pattern of expression during embryogenesis. *EMBO J.* **8**, 91–100 (1989).



86. Han, J. *et al.* Concerted action of Msx1 and Msx2 in regulating cranial neural crest cell differentiation during frontal bone development. *Mech. Dev.* **124**, 729–745 (2007).
87. Chen, Y. H., Ishii, M., Sucov, H. M. & Maxson, R. E. Msx1 and Msx2 are required for endothelial-mesenchymal transformation of the atrioventricular cushions and patterning of the atrioventricular myocardium. *BMC Dev. Biol.* **8**, (2008).
88. Bergwerff, M., Verberne, M. E., DeRuiter, M. C., Poelmann, R. E. & Gittenberger-de Groot, A. C. Neural crest cell contribution to the developing circulatory system implications for vascular morphology? *Circ. Res.* **82**, 221–231 (1998).
89. Nakamura, T., Colbert, M. C. & Robbins, J. Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system. *Circ. Res.* **98**, 1547–1554 (2006).
90. Majesky, M. W. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27**, 1248–1258 (2007).
91. Jiang, X., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P. & Sucov, H. M. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* **127**, 1607–1616 (2000).
92. Bowles, J., Schepers, G. & Koopman, P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* **227**, 239–255 (2000).
93. Liu, J. P. & Jessell, T. M. A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development* **125**, 5055–5067 (1998).
94. Cheung, M. & Briscoe, J. Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development* **130**, 5681–5693 (2003).
95. McKeown, S. J., Lee, V. M., Bronner-Fraser, M., Newgreen, D. F. & Farlie, P. G. Sox10

- overexpression induces neural crest-like cells from all dorsoventral levels of the neural tube but inhibits differentiation. in *Developmental Dynamics* **233**, 430–444 (2005).
96. Zhao, H., Bringas, P. & Chai, Y. An in vitro model for characterizing the post-migratory cranial neural crest cells of the first branchial arch. *Dev. Dyn.* (2006).  
doi:10.1002/dvdy.20588
97. Kerosuo, L., Nie, S., Bajpai, R. & Bronner, M. E. Crestospheres: Long-term maintenance of multipotent, premigratory neural crest stem cells. *Stem Cell Reports* (2015).  
doi:10.1016/j.stemcr.2015.08.017
98. Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. & De Crombrughe, B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* **22**, 85–89 (1999).
99. Mori-Akiyama, Y., Akiyama, H., Rowitch, D. H. & de Crombrughe, B. Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003). doi:10.1073/pnas.1631288100
100. Meech, R., Edelman, D. B., Jones, F. S. & Makarenkova, H. P. The homeobox transcription factor Barx2 regulates chondrogenesis during limb development. *Development* **132**, 2135–2146 (2005).
101. Gu, J. *et al.* Identification and characterization of the novel Col10a1 regulatory mechanism during chondrocyte hypertrophic differentiation. *Cell Death Dis.* (2014).  
doi:10.1038/cddis.2014.444
102. Mina, M., Wang, Y. H., Ivanisevic, A. M., Upholt, W. B. & Rodgers, B. Region- and stage-specific effects of FGFs and BMPs in chick mandibular morphogenesis. *Dev. Dyn.* (2002). doi:10.1002/dvdy.10056
103. Craft, A. M. *et al.* Specification of chondrocytes and cartilage tissues from embryonic

stem cells. *Development* (2013). doi:10.1242/dev.087890

104. Curchoe, C. L. *et al.* Early acquisition of neural crest competence during hESCs neuralization. *PLoS One* **5**, (2010).
105. Vega-Lopez, G. A., Cerrizuela, S., Tribulo, C. & Aybar, M. J. Neurocristopathies: New insights 150 years after the neural crest discovery. *Dev. Biol.* (2018).  
doi:10.1016/J.YDBIO.2018.05.013

## **ANEXO 1: TABLAS**

**Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para amplificar el cDNA de Hes1 y Msx1**

Oligonucleótido	Secuencia (5'–3')
mHes1-Fw (HidIII) <sup>a,b</sup>	<u>AAGCTT</u> atgccagctgatataatggagaaa
mHes1-Rev (BamHI) <sup>a,b</sup>	GGATCCagttccgccacggctcca
GR-For (SacI) <sup>a,b</sup>	<u>GAGCTC</u> cacaagaaacctctgaaaatcctggtaac
GR-Rev (XhoI) <sup>a,b</sup>	CTCGAGctgattggatgatttcagc
mMsx1-Fw (HindIII) <sup>a,b</sup>	<u>AAGCTT</u> atgacttctttgccactcggtg
mMsx1-Rev (BamHI) <sup>a,b</sup>	<u>GGATCC</u> aagtcaggtggtacatgctgtagcc

a La secuencia del sitio de restricción se encuentra subrayada

b La secuencia específica está resaltada con letras en negrita

**Tabla 2. Plásmidos obtenidos con los transgenes de Hes1 y Msx1**

Nombre del plásmido	Numero de Acceso a NCBI y nombre	Vector plasmídico	Referencia
hGR-pcDNA3.1-myc-His	HQ692822, <i>Homo sapiens glucocorticoid nuclear receptor</i> mRNA	pcDNA3.1(+)/myc-His A <sup>™</sup> Invitrogen	Current work.
<i>mHes1</i> -hGR-pcDNA3.1-myc-His	BC051428, <i>Mus musculus hairy and enhancer of split 1</i> , mRNA.	hGR-pcDNA3.1-myc-His (Current work)	Current work.
<i>mMsx1</i> -hGR-pcDNA3.1-Hygro	BC016426, <i>Mus musculus homeobox 1, msh-like 1</i> , mRNA	hGR-pcDNA3.1-myc-His (Current work)	Current work

**Tabla 3.- Secuencia de oligonucleótidos para el análisis de las clonas que incorporaron los transgenes Hes1 y/o Msx1.**

Gene	Número de acceso	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia anti-sentido (5'-3')
Gapdh	NM_00128972 6.1	ATCACCATCTTCCAGGAGCG	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
GR	HQ692822	GTTGGAGGTTATTGAACCTGA AG	TTCATGCATAGAATCCAAGAG
GR/myc-His	HQ692822/His -Tag	CTGACAAAACCTCTTGGATTCT ATGC	GATGATGACCGGTATGCATATTCA
HGR	NM_008235/ HQ692822	TCTACACCAGCAACAGTGG	TGAATATGCATACCGGTCATCATC
MGR	NM_010835.2/ HQ692822	CCTACGCAAGCACAAGACCA	GGTAGGGGTGAGTTGTGGTA

**Tabla 4.- Secuencias de oligonucleótidos para PCR punto final**

Gene	Número de acceso	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia anti-sentido (5'-3')
$\beta$ -actin	NM_007393	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	GGTCTCAAACATGATCTGGG
Hes1	NM_008235	TCTACACCAGCAACAGTGG	TCAAACATCTTTGGCATCAC
Msx1	NM_010835.2	CGTGGTCCCCAGCAGAATTA	GCTGGGCTCCTTGCTTTCTA
Snai1	NM_011427	GTGGAAAGGCCTTCTCTAGGC	CAGACTCTTGGTGCTTGTGG
Sox2	NM_011443.4	GCACATGAACGGCTGGAGCAA CG	TGCTGCGAGTAGGACATGCTGTA GG
Sox9	NM_011448	AGCTCACCAGACCCTGAGAA	TCCCAGCAATCGTTACCTTC
Sox10	NM_011437	GCAGGAAGGGTTAGGGTAGG	GCGGAGAAAGGATCAGAGTG



**Tabla 5.- Secuencias de oligonucleótidos para PCR tiempo real.**

Gene	Número de acceso	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia anti-sentido (5'-3')
<i>Aggrecan</i>	NM_007424.3	ccttctccagcttcttgagc	ggcagtggaactgtctcagg
<i>Col2a1</i>	NM_001113515.2	GAAGGTGCTCAAGGTTCTCG	CTCCAGGAATACCATCAGTCC
<i>Col10a1</i>	NM_009925.4	CAATGGCAGCAGCATTACG	GCGTGCCGTTCTTATACAGG
Oct4	NM_001252452.1	TTGGGCTAGAGAAGGATGTGGTT	GGAAAAGGGACTGAGTAGAGTGTGG
<i>Pax6</i>	NM_001244198.2	CACCAGACTCACCTGACACC	CGAATACGGGGCTCTGAGAA
Sox1	NM_009233.3	ATGATGCAGGAGGCACAGC	CCATGCACCGCTACGACAT
Sox2	NM_011443.4	GCACATGAACGGCTGGAGCAACG	TGCTGCGAGTAGGACATGCTGTAGG
$\alpha$ -SMA (Acta2)	NM_007392.3	CTAAGGCCAACC GGGAGAAA	AGTCCAGCACAATACCAGTTGT
$\beta$ - <i>Tubulina</i> <i>III</i>	(NM_023279.2	GGCCTCCTCTCACAAGTATGT	TTGCCAGCACCACTCTGAC
Nanog	NM_028016.3	TATCTGGTGAACGCATCTGG	GAAGTTATGGAGCGGAGCAG
$\beta$ -actina	NM_007393	GGTCTCAAACATGATCTGGG	GGTCTCAAACATGATCTGGG

**Tabla 6. Anticuerpos primarios para la detección de proteínas específicas.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Hecho en</b>	<b>Dilución</b>	<b>Num. Catálogo</b>
<b>COL2A1</b>	ratón	1:200	sc-518017
<b>6X-HIS TAG</b>	ratón	1:400	Ab18184
<b>MSX1/2</b>	ratón	1:500	Hybridoma 4G1
<b>OCT4</b>	ratón	1:750	B&D 611202
<b>SOX2</b>	conejo	1:750	Millipore , AB5603
<b>SOX10</b>	ratón	1:750	Abcam
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	ratón	1:400	Sigma-Aldrich A2547
<b>TUJ1 (<math>\beta</math>-TUBULINA III)</b>	conejo	1:1000	Babco Covance MRB-435P-100
<b>NANOG</b>	conejo	1:1000	Prepotech 500-P236

## **ANEXO 2: ARTÍCULO REQUISITO**



Article

# Activation of *Hes1* and *Msx1* in Transgenic Mouse Embryonic Stem Cells Increases Differentiation into Neural Crest Derivatives

Karla Méndez-Maldonado <sup>1,2,3</sup> , Guillermo Vega-López <sup>4,5</sup> , Sara Caballero-Chacón <sup>6</sup>,  
Manuel J. Aybar <sup>4,5,\*</sup> and Iván Velasco <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Instituto de Fisiología Celular—Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México; karlam@email.ifc.unam.mx
  - <sup>2</sup> Laboratorio de Reprogramación Celular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, Ciudad de México 14269, México
  - <sup>3</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México; Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México
  - <sup>4</sup> Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO, CONICET-UNT), San Miguel de Tucumán T4000ILL, Argentina; gavegalopez@gmail.com
  - <sup>5</sup> Instituto de Biología “Dr. Francisco D. Barbieri”, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán T4000ILL, Argentina
  - <sup>6</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México; saracachas@hotmail.com
- \* Correspondence: mjaybar@fbqf.unt.edu.ar (M.J.A.); ivelasco@ifc.unam.mx (I.V.); Tel.: +52-55-5622-56-49 (I.V.)

Received: 7 November 2018; Accepted: 1 December 2018; Published: 13 December 2018



**Abstract:** The neural crest (NC) comprises a multipotent cell population that produces peripheral neurons, cartilage, and smooth muscle cells, among other phenotypes. The participation of *Hes1* and *Msx1* when expressed in mouse embryonic stem cells (mESCs) undergoing NC differentiation is unexplored. In this work, we generated stable mESCs transfected with constructs encoding chimeric proteins in which the ligand binding domain of glucocorticoid receptor (GR), which is translocated to the nucleus by dexamethasone addition, is fused to either *Hes1* (HGR) or *Msx1* (MGR), as well as double-transgenic cells (HGR+MGR). These lines continued to express pluripotency markers. Upon NC differentiation, all lines exhibited significantly decreased *Sox2* expression and upregulated *Sox9*, *Snai1*, and *Msx1* expression, indicating NC commitment. Dexamethasone was added to induce nuclear translocation of the chimeric proteins. We found that *Collagen IIa* transcripts were increased in MGR cells, whereas coactivation of HGR+MGR caused a significant increase in *Smooth muscle actin* ( $\alpha$ -*Sma*) transcripts. Immunostaining showed that activation in HGR+MGR cells induced higher proportions of  $\beta$ -TUBULIN III<sup>+</sup>,  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> and COL2A1<sup>+</sup> cells. These findings indicate that nuclear translocation of MSX-1, alone or in combination with HES-1, produce chondrocyte-like cells, and simultaneous activation of HES-1 and MSX-1 increases the generation of smooth muscle and neuronal cells.

**Keywords:**  $\beta$ -Tubulin III; smooth muscle actin; collagen 2a; chondrocyte induction; smooth muscle cell induction; stromal-derived inducing activity

## 1. Introduction

The neural crest (NC) comprises a transient multipotent cell population that emerges between the forming neural plate and nonneural ectoderm. The NC is a unique and highly specialized group of cells found in all vertebrates. The NC delaminates from the dorsal neural tube following its closure to

migrate along different pathways [1,2]. These cells contribute to a wide variety of derivatives, including neural cells of sensory and autonomic ganglia of the peripheral nervous system, the cartilage and bones of the face, melanocytes and smooth muscle cells, as well as other tissues [3–6]. The induction and specification of NC cells have been studied in different animal models. In avian, amphibian, and fish embryos, NC specification is thought to be initiated during gastrulation or even earlier [7–9].

Some of the genes and signals involved in induction of the NC have been identified from studies in chicks, frogs, and zebrafish. Bone morphogenic proteins (BMPs), Fibroblast growth factor (FGF), Wnt, retinoic acid, and Notch participate in this process [10–16]. Embryonic stem cells (ESCs) derived from mouse and human blastocysts have been extensively employed for studies of developmental processes [6,17–20]. A recent study in *Xenopus laevis* found that some of the transcription factors associated with the development of the NC are coexpressed with pluripotency factors at the blastula and gastrula stages. In ectodermal explants, high Activin concentrations induced the expression of mesodermal and endodermal markers in the blastula but not gastrula stage. Ectopic expression of either Pax3/Zic1 or Snai2/Wnt8 made gastrula explants competent to produce myogenic differentiation 1 (MyoD) and Endodermin. The authors propose that the NC factors can also be viewed as pluripotency maintenance factors [21]. Recently, in vitro differentiation of human embryonic stem cells demonstrated that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling plays an important role in launching early genes that are required for NC development [22].

The importance of other pathways is still being studied: Notch signaling involvement was established through studies in which gain- or loss-of-function of Notch signaling or the Notch effectors, *Hes* genes, were associated with specification, induction or NC migration [23–26]. However, many experimental approaches are designed in a nonregulated fashion, precluding analysis at different time points during NC induction. For example, mutation of *Hes1* has shown that this gene is essential for neuroblast development in the central nervous system, and therefore, mouse embryos showed abnormalities in neural tube closure, defects in the eyes and ears, as well as craniofacial malformations [27,28].

BMP signaling is relevant during NC differentiation in vivo. Activation of BMP receptors upregulates *Msx1* in the neural fold region. In *Xenopus* multipotent ectodermal tissue (animal caps), a BMP concentration similar to that required to induce the NC increased *Msx1* levels [29]. Recently, a study performed in hESCs demonstrated that BMP signaling is required for NC induction: early inhibition of BMP receptors caused a dramatic inhibition of human NC induction [22]. On the other hand, *Msx1* has been implicated in NC development, since animals with knock-out of this gene die at birth and present multiple craniofacial defects, including cleft palate, as well as a reduction of the jaw and maxilla [30,31]. Similarly, conditional elimination of *Sox9* in the cranial NC, resulted in the absence of cartilages and endochondral bones [32]. Articular cartilage is formed by chondrocytes that express collagens and aggrecan, whereas hypertrophic growth plate chondrocytes undergo apoptosis and provide a template for bone deposition [33].

In *X. laevis* embryos, chimeric versions of *HAIRY2A* (mouse homologue of *Hes1*) and *MSX-1* fused to the ligand binding domain of human glucocorticoid receptor (GR) was used to activate HES-1 and MSX-1 by inducing their nuclear translocation after dexamethasone (Dex) addition. When the chimeric protein contained activation domains, an increase in the NC territories labeled with the markers *SNAI1* and *FOXD3* was observed. Conversely, when a dominant negative mutant of *HAIRY2A* and *MSX-1* was expressed, a decrease in these NC markers was reported. In animal cap assays, stimulation of either of the inducible chimeric proteins (*HAIRY2A* or *MSX-1*) with Dex led to upregulation of *Sox2*, a neural plate marker; however, coexpression of *Hairy2a* and *Msx1* produced a decrease in *SOX2* expression and increased the expression of the NC marker *SNAI1*. This indicates that coexpression of both transcription factors induces NC markers in *X. laevis* [16].

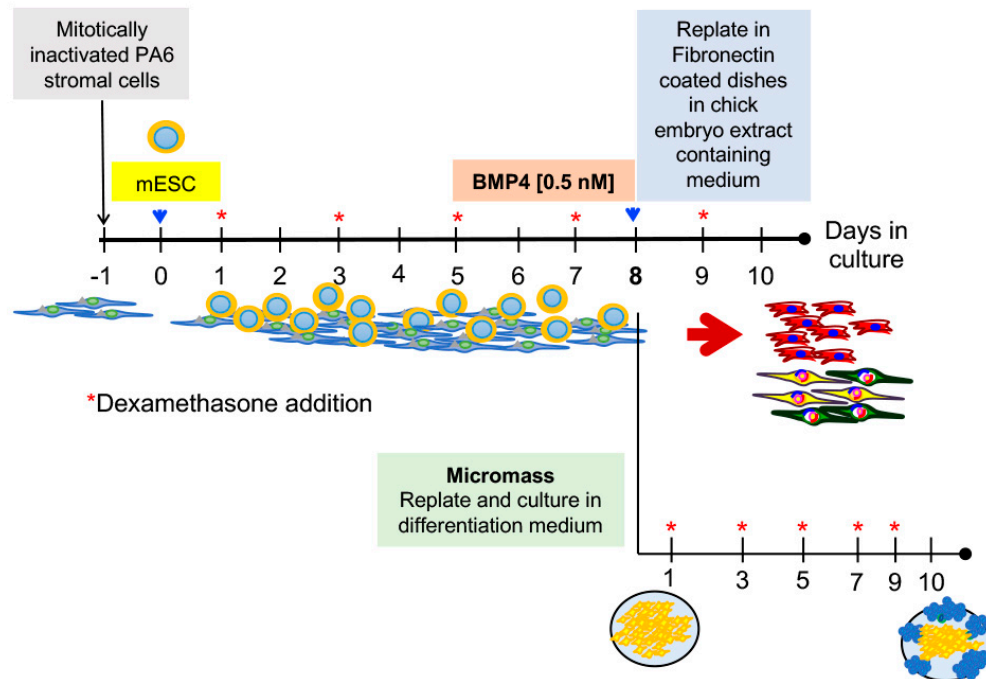
The aim of this work was to establish whether HES-1 and MSX-1 participate in the induction/differentiation of the NC using pluripotent mammalian ESCs as a model. To test this hypothesis, we overexpressed inducible forms of HES-1 and MSX-1 proteins in mouse ESCs and

evaluated differentiation into NC derivatives, including neural, smooth muscle, and chondrocyte-like cells, after activation of these transcription factors.

## 2. Results

### 2.1. Expression of *Hes1* and *Msx1* in Wild-type ES Cells in Pluripotent Conditions and after NC Differentiation

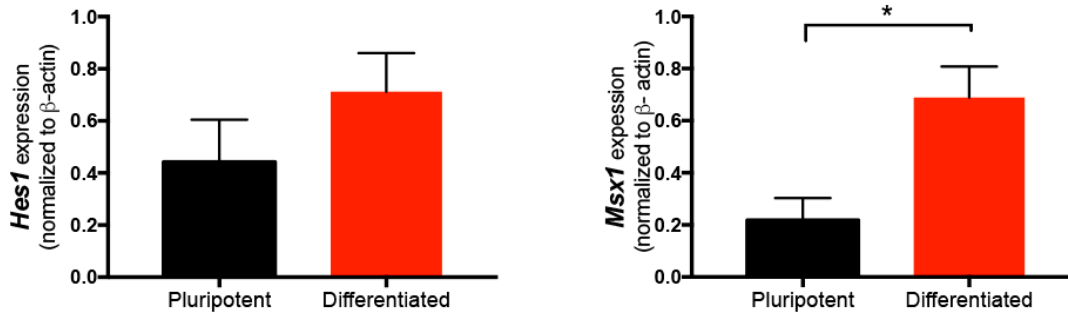
To analyze the role of *Hes1* and *Msx1* in the differentiation of mESCs into neural crest cells, we used the stromal cell-inducing activity of Pre-adipose 6 (PA6) cells for 5 days [17], followed by the addition of BMP4, which commits cells to differentiate into NC derivatives [6]. Cultures were treated from day 5 to day 8 with 0.5 nM BMP4. At day 8, the cells were harvested by Papain treatment and plated on Fibronectin-coated dishes in neural differentiation medium with chick embryo extract without BMP4, a condition reported to favor differentiation into smooth muscle cells ( $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>) and neural derivatives ( $\beta$ -TUBULIN III<sup>+</sup>) [6] (Figure 1). Although we did not separate PA6 cells after replating, these cells did not proliferate, and their contribution to the measured parameters was constant for all conditions. At day 8, some cultures were dissociated and replated in micromass conditions to test their chondrogenic potential (Figure 1).



**Figure 1.** Differentiation of pluripotent cells into neural crest derivatives. The scheme shows the neural crest differentiation protocol. PA6 stromal cells were mitotically inactivated and plated in a monolayer to induce neural differentiation of mouse embryonic stem cells. The addition of BMP4 from day 5 to day 8 promoted the acquisition of a neural crest fate. At day 8, the cells were harvested with Papain and replated in Fibronectin-coated dishes or plated on micromass conditions. After 2 additional days, neurons and smooth muscle cells were detected. The micromasses were stained with Alcian blue after 10 days. Blue arrows indicate replating. The red asterisks indicate the addition of dexamethasone, starting at day one, to promote nuclear entry of the different constructs. The PA6 protocol was modified from [6] and the procedure for micromasses formation was modified from [34].

To assess the levels of expression of endogenous *Hes1* and *Msx1* in wild-type pluripotent cells, end-point RT-PCR was performed in RNA extracted from cultures grown in 2i/Leukemia inhibitory factor (LIF) without Dex. In W9.5 cells subjected to NC differentiation, we observed a non-significant

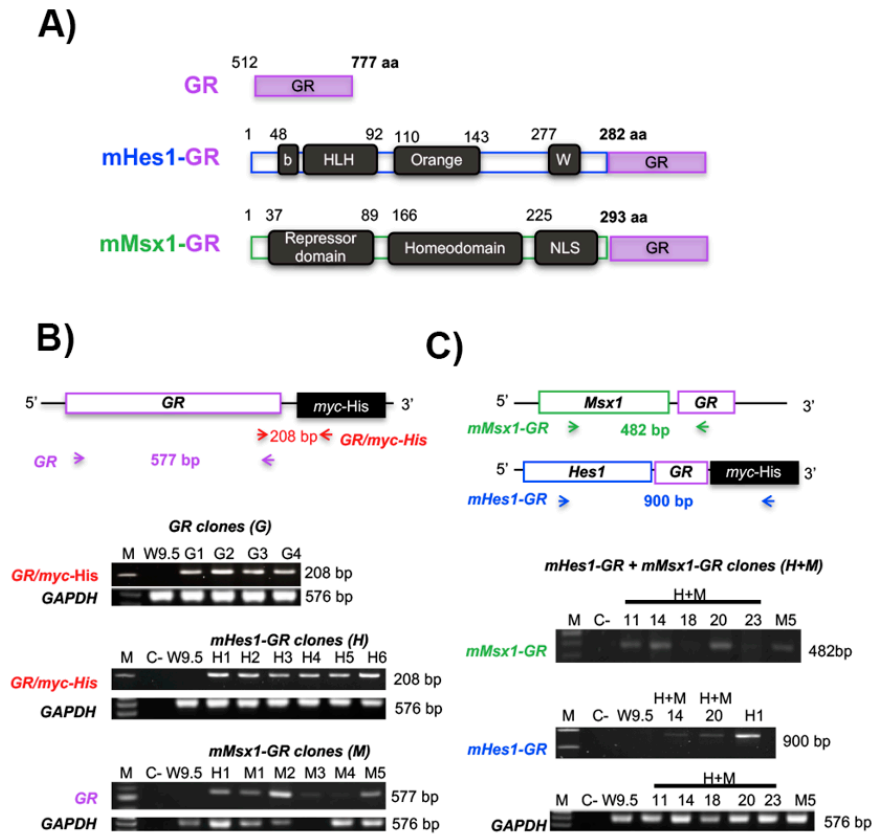
increase in *Hes1* and a significant rise in *Msx1* (Figure 2). These results indicate that upregulation of *Msx1* is observed after NC induction of mESCs. However, it is not known if a controlled and sustained stimulation, causing nuclear translocation of either or both transcription factors, can influence NC commitment during differentiation of pluripotent cells. Therefore, an inducible system might be useful to test this idea.



**Figure 2.** Expression of *Hes1* and *Msx1* in pluripotent conditions and in cells differentiated to NC. Semiquantitative RT-PCR to measure the endogenous transcripts of these two genes in pluripotent W9.5 cells cultured in 2i/LIF, and after 10 days of differentiation in the PA6 protocol. The expression of *Hes1* increased non-significantly. On the other hand, we detected a significant increase in *Msx1* expression after NC differentiation. mean  $\pm$  SEM is represented. Statistical analysis was conducted via one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test to establish differences. \*  $p = 0.032$ .

## 2.2. HES-1-GR and MSX-1-GR Translocate to the Nucleus

The use of GR as an inducible system, activated by Dex, allows the timely stimulation of nuclear translocation of transcriptional regulators, to study the effects on cell differentiation. To test if the inducible system was activated by Dex to promote nuclear translocation, we cloned GR or *Hes1*-GR (HGR) cDNA sequences into a pcDNA3.1/myc-His vector, which has a 6X-His tag that can be recognized with a specific antibody. We also cloned the *Msx1*-GR (MGR) cDNA sequence into pcDNA3.1-Hygromycin B (Figure 3 and Figure S1). The resulting plasmids were named GR, HGR, and MGR, respectively. These vectors were used to transiently transfect mouse embryo fibroblast (NIH-3T3) cells to evaluate nuclear translocation after Dex addition more easily than in mESCs, which have a very reduced cytoplasm. We assessed different concentrations of Dex (10, 50 and 100  $\mu$ M) to obtain maximal nuclear translocation of each construct, and we decided to stimulate with the lowest tested concentration that caused a significant translocation effect. We measured the nuclear translocation using ImageJ software. In HGR cells, we quantified the fluorescence using an equation to obtain the Corrected Cell Fluorescence (CCF) in the nucleus (Figure S2A). We observed an increase in the nuclear CCF after inducing nuclear translocation with Dex. In the case of MGR, we counted cells that had an exclusive nuclear signal after immunostaining and quantified the percentage of MSX-1 cells with positive labeling (Figure S2B). After confirming that this system worked in mouse cells, we generated stable transgenic mESC lines.



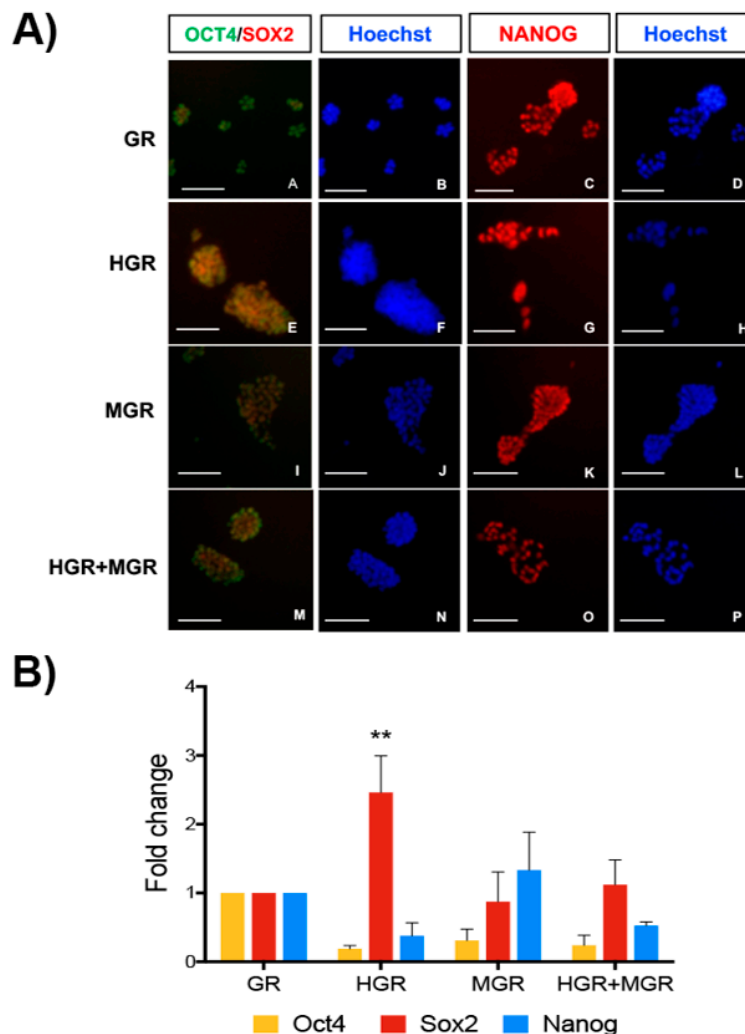
**Figure 3.** Generation of transgenic mouse embryonic stem cells that express *Hes1* and *Msx1*. (A) Scheme of the ligand binding domain of human glucocorticoid receptor (GR) that served as the control. The full-length cDNA of *Hes1* and *Msx1* was cloned in-frame with GR to produce *Hes1*-GR (HGR) or *Msx1*-GR (MGR) vectors. (B) After electroporation and selection of mouse embryonic stem cells transfected with the different plasmids, the cells were genotyped via PCR analysis of genomic DNA with the indicated primers, indicated by arrows. The GR fragment was identified with 2 different sets of primers to identify clones, which were designated G. For cells electroporated with the *Msx1*-GR or *Hes1*-GR plasmids, several positive clones were identified and designated H or M, respectively. (C) Embryonic stem cells were transfected with both *Hes1*-GR and *Msx1*-GR plasmids. To identify double-positive clones (H+M), the indicated primers were used. Clones 14 and 20 incorporated both constructs. Genomic DNA of W9.5 mouse embryonic stem cells was used as a negative control. (C-) indicates a negative control consisting of water in place of DNA in the PCR reaction.

### 2.3. Generation of Transgenic Stable mESC Lines

We transfected W9.5 mESCs with the GR, HGR, MGR, or both the HGR and MGR plasmids by electroporation, followed by antibiotic selection with 300 µg/mL G418 (GR and HGR), 200 µg/mL Hygromycin B (MGR) or both antibiotics for HGR+MGR for 10 days. The cells were maintained with 100 µg/mL G418 or 110 µg/mL Hygromycin B for 11 more days to obtain several colonies, which were picked and expanded in Knock Out-Dubelco's Modified Eagle's Medium (KO-DMEM) with LIF and 2i. We obtained genomic DNA from these clones to identify the transgenes using specific primers for GR/myc-His (208 bp), GR (577 bp), MGR (482 bp) or HGR (900 bp), as presented in the scheme shown in Figure 3B,C. *Gapdh* was also detected (576 bp). After genotyping, we identified several clones with the GR (four clones), HGR (six clones), MGR (five clones) or HGR+MGR (two clones) constructs (Figure 3B,C). The identified positive clones were selected for differentiation based on the best morphology of the pluripotent colonies.



To further assess whether these transgenes affected pluripotency markers, we performed immunostaining for OCT4, SOX2, and NANOG in the parental cell line W9.5 and the selected clonal lines (Figure 4A), and we observed that the transgenic lines were positive for these markers. Consistently, RT-qPCR detection of *Oct4*, *Sox2* and *Nanog* showed similar levels in all transgenic cell lines, except for a significant increase in *Sox2* in HGR cells (Figure 4B). This increase does not affect the pluripotent state, since mESCs can express high levels of *Nanog* [35] and HGR cells continue to express *Oct4* and *Sox2* at the mRNA and protein levels; these 3 transcription factors conform the core positive autoregulatory network of pluripotency [36].

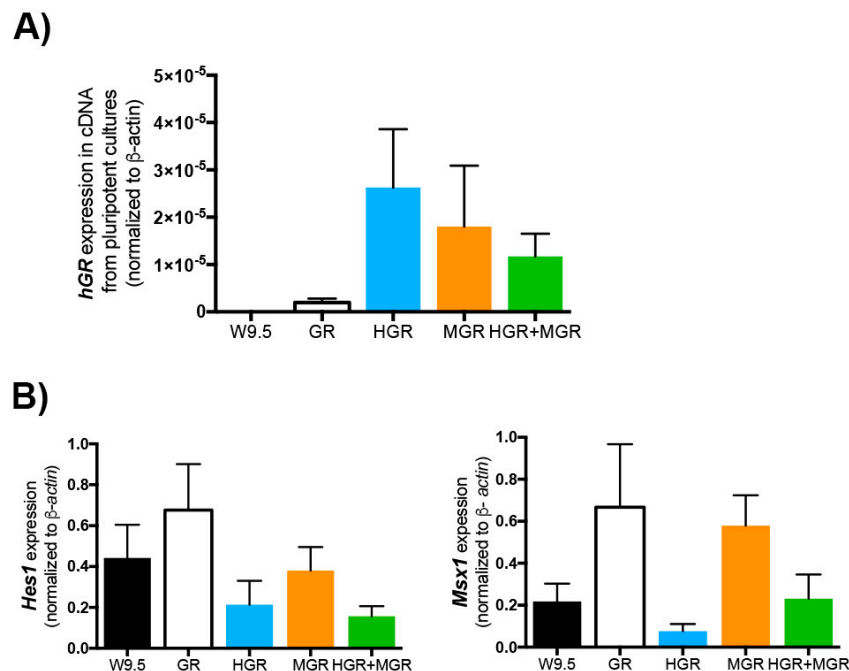


**Figure 4.** Transgenic mESCs remain pluripotent. (A) We evaluated the expression of OCT4, SOX2 and NANOG in the transgenic cells via immunofluorescence and observed that the selected clones continued to express these pluripotent factors. Scale bars = 100  $\mu$ m. (B) The expression of pluripotency factors was evaluated by RT-qPCR in all transgenic cell lines. Two-way ANOVA followed by Tukey's test indicated only a significant difference in Sox2 expression for the HGR clone compared with the control GR clone after comparison of all cell lines. \*\*  $p < 0.0025$ .

#### 2.4. Expression of the Human Glucocorticoid Receptor, *Hes1* and *Msx1* are Similar in the Transgenic Cell Lines before Differentiation.

Since the integration of plasmids in mESCs is randomized, we tested the expression level of the human GR, which is included in all the transgenic constructs, in cDNA prepared from cultures growing

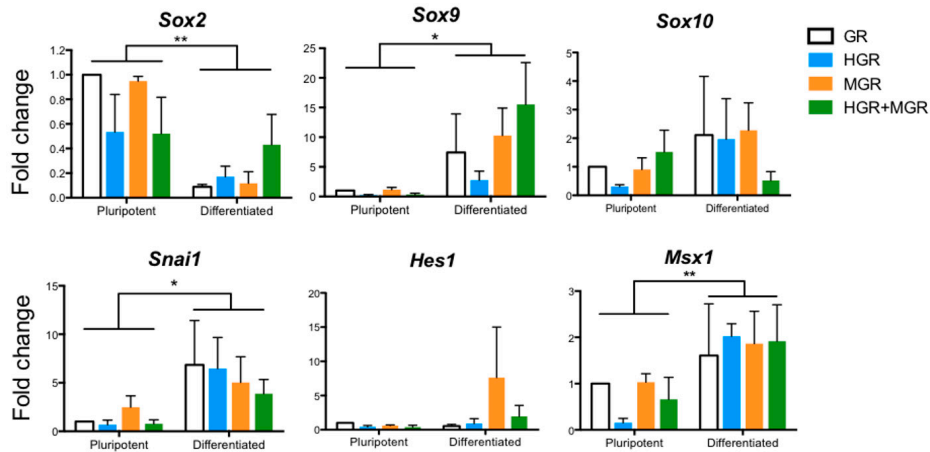
with 2i/LIF, using wild-type W9.5 mESCs as a negative control. Quantitative PCR in W9.5 cells did not result in amplification as expected. All transgenic lines express the transgene. We did not find significant differences, suggesting that all lines express comparable levels of transgenes (Figure 5A). Additionally, to compare the endogenous levels of expression of *Hes1* and *Msx1* in wild-type and transgenic pluripotent cells, end-point PCR was performed in cDNA prepared from cultures grown in 2i/LIF without Dex. No significant differences were detected in the expression of these two genes in undifferentiated conditions (Figure 5B).



**Figure 5.** RT-PCR to detect the transgenic human glucocorticoid receptor and the endogenous *Hes1* and *Msx1* in pluripotent wild-type and transgenic lines. RNA was obtained from W9.5, GR, HGR, MGR, and HGR+MGR cells growing in 2i/LIF. Retrotranscription was made to prepare cDNA, which was amplified by qPCR (A) with the primers listed in Methods. Wild-type W9.5 mESCs did not express the transgene. The expression of the transgenic sequence present in all plasmids was normalized to  $\beta$ -actin. (B) Semiquantitative RT-PCR was used to measure transcripts of these two genes in pluripotent W9.5 (non-transgenic) and transgenic (GR, HGR, MGR, and HGR+MGR) cells, cultured in 2i/LIF. mean  $\pm$  SEM is represented. Statistical analysis was conducted via one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test to establish differences. No significant differences were found between the four transgenic cell lines in 3–4 independent experiments.

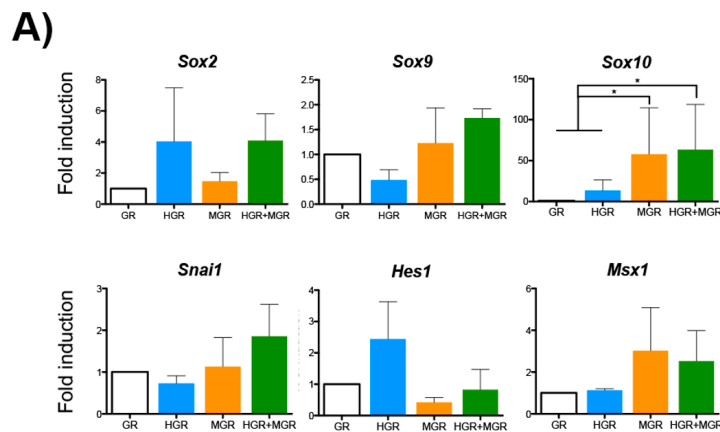
### 2.5. Neural and NC Marker Expression in Transgenic Pluripotent and Differentiated Cells

After 10 days of differentiation under control conditions, we extracted RNA and performed RT-PCR to analyze the expression of different NC markers (Figure 6). The expression of each gene was normalized to  $\beta$ -actin levels and is presented as fold change with respect to expression in control pluripotent cells (GR). In this assay, we analyzed the expression of endogenous *Msx1* and *Hes1*, as well as *Sox2* and NC markers (*Sox9*, *Sox10*, and *Snai1*) after NC differentiation. We observed significant differences when mESCs were subjected to differentiation into NC derivatives. *Sox2* expression decreased, whereas *Sox9*, *Snai1*, and *Msx1* expression was augmented in all cell lines relative to pluripotent GR cells. No significant differences were found in *Sox10* and *Hes1* between the four cell lines under pluripotent or differentiated conditions. These molecular changes are consistent with the transcriptional response observed after NC differentiation of ESCs [19,22].

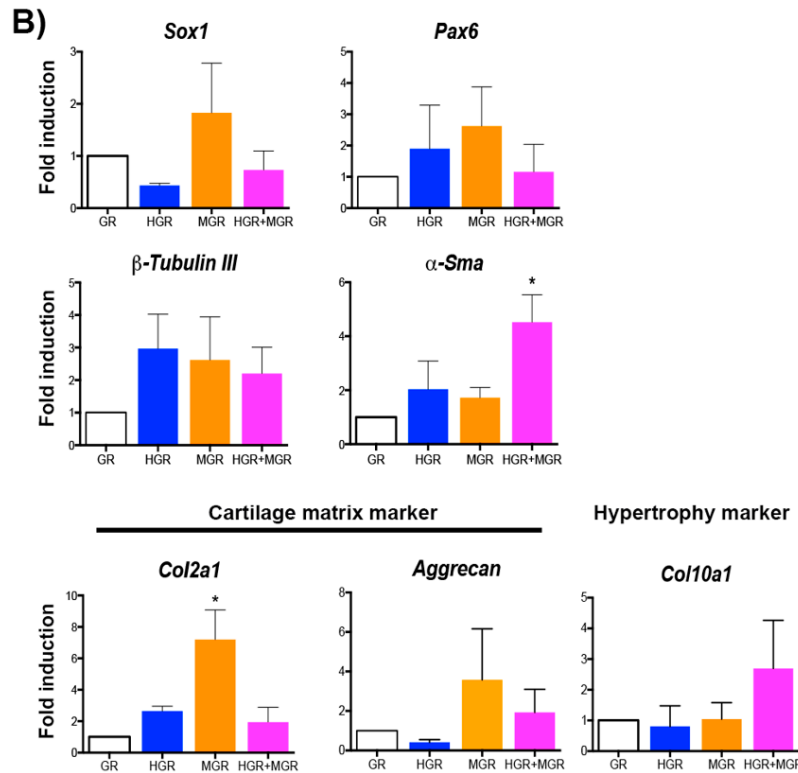


**Figure 6.** Induction of neural crest markers in differentiated cells in the absence of dexamethasone. The transgenic cells were differentiated into neural crest derivatives over 10 days. The expression of several markers was measured using end point RT-PCR. The expression of each gene was normalized to  $\beta$ -actin expression, and the fold change was determined relative to the levels found in pluripotent GR cells. mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was conducted via two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test to establish differences between pluripotent and differentiated cells from 3 independent experiments. \*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.001$ . No differences were found between the four cell lines when compared at in the pluripotent state or after differentiated conditions, indicating that the significant differences are caused by the differentiation protocol.

To evaluate the role of HES-1 and MSX-1 activation, Dex was added from day 1 of differentiation. RNA was obtained at day 10 of differentiation to evaluate the same genes using semiquantitative RT-PCR. It is noteworthy that the primers for *Hes1* and *Msx1* detect the endogenous forms and not the transgenes. We only observed significant increases in *Sox10* expression in MGR and HGR+MGR cells relative to the control GR and HGR cells after stimulation of nuclear translocation (Figure 7A). Evaluation of NC markers via RT-qPCR revealed that in Dex-treated double-transgenic cells, the activation of HES-1 and MSX-1 nuclear translocation increased  $\alpha$ -*Sma* transcripts, suggesting increased differentiation to smooth muscle cells, one type of NC derivative (Figure 7B). In contrast, the levels of other genes related to neural differentiation (*Pax6*, *Sox1*, and  $\beta$ -*Tubulin III*) did not change. Analysis of additional NC markers such as Type II Collagen gene (*Col2a1*) expression, characteristic of chondrocytes, was increased in MGR cells, but other chondrocytic markers (*Aggrecan* and *Col10a1*) were unaffected (Figure 7B).



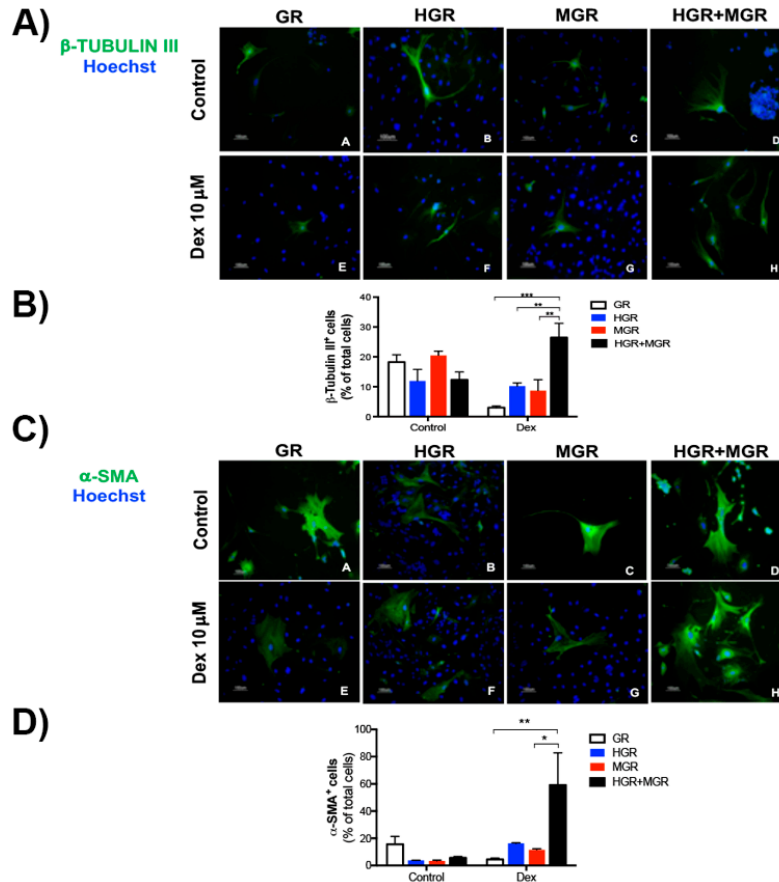
**Figure 7.** Cont.



**Figure 7.** Activation of nuclear translocation of chimeric proteins during differentiation of mESCs into NC derivatives increased the *Col2a1* transcripts in MGR cells and *α-Sma* transcripts in double transgenic cells. Transgenic mESCs were differentiated into neural crest derivatives and stimulated with 10  $\mu$ M Dex to promote nuclear translocation of the transgenic proteins from day 1. Analyses were conducted at day 10 of differentiation. (A) End point RT-PCR showed significant increases in *Sox10* expression in MGR and HGR+MGR cells relative to GR and HGR cells after stimulation of nuclear translocation. Please note that the primers for *Hes1* and *Msx1* detect the endogenous forms and not the transgenes (B) Quantification of the neural and neural crest differentiation markers via RT followed by qPCR. The fold induction was relative to the levels in GR cells. The data for each transcript were normalized to  $\beta$ -actin levels. mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis of all conditions was conducted via ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test from 3–4 independent experiments. The marked significant differences are relative to GR, unless indicated otherwise. \*  $p < 0.05$ .

#### 2.6. Activation of HES-1 and MSX-1 Increased the Number of $\beta$ -TUBULIN III- and $\alpha$ -SMA-positive Cells

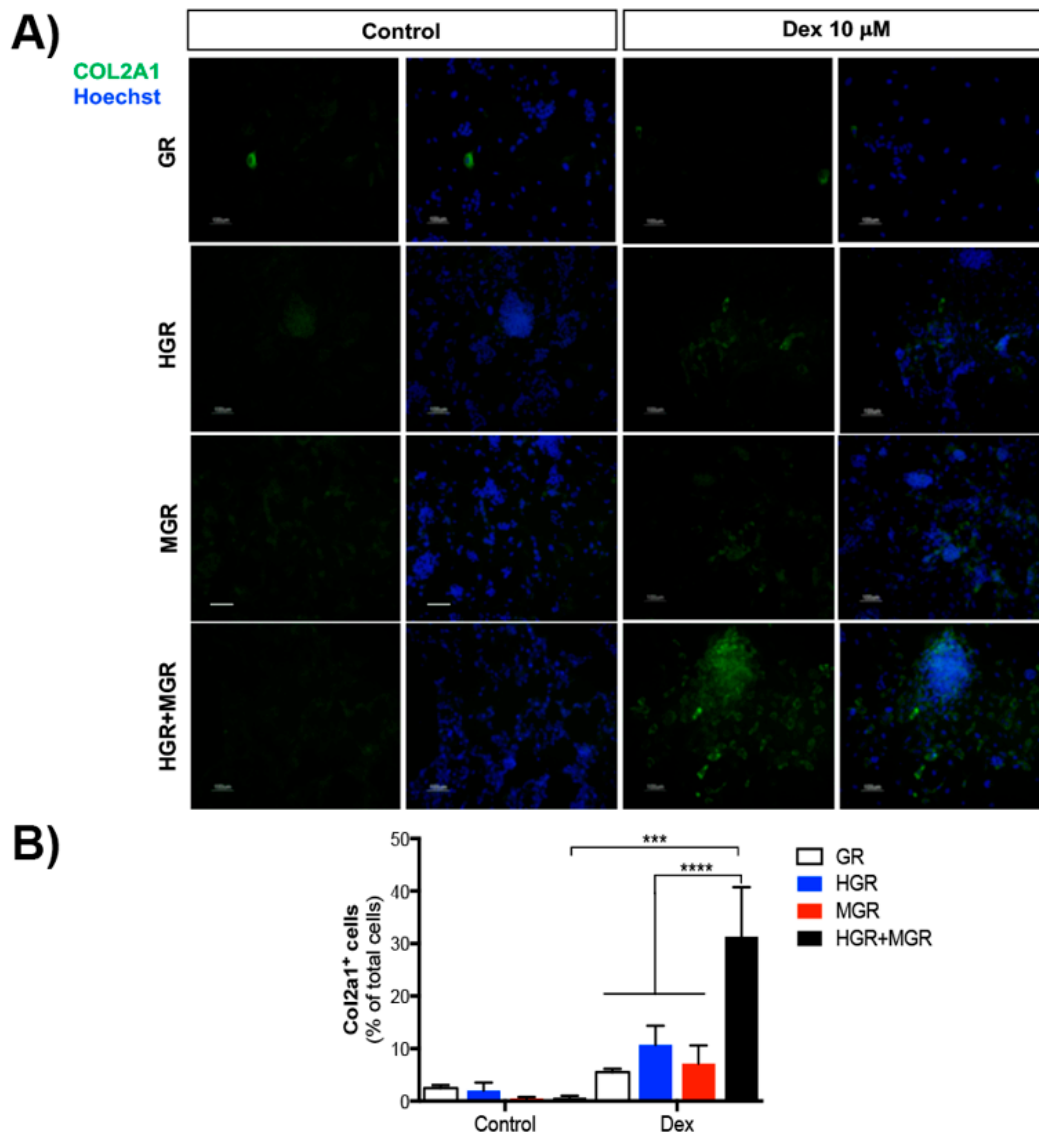
Transgenic mESC lines differentiated using the NC protocol with PA6 stromal cells were fixed at day 10 to perform immunofluorescence staining with specific antibodies. We detected the expression of  $\beta$ -Tubulin III in cells that were small and exhibited a multipolar morphology under all conditions (Figure 8A); quantification of immuno-positive cells showed that the number of  $\beta$ -TUBULIN III-positive cells significantly increased when the nuclear translocation of HES-1 and MSX-1 was induced with Dex (Figure 8B). Since real-time PCR indicated that nuclear translocation in double-transgenic cells upregulated Smooth muscle actin expression, antibodies for  $\alpha$ -SMA were used to examine differentiated cells. The control and treatment conditions produced large, filamentous and polyhedral  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> cells (Figure 8C); however, quantification of the number of cells positive for this marker showed a significant increase when HGR+MGR cells were activated (Figure 8D).



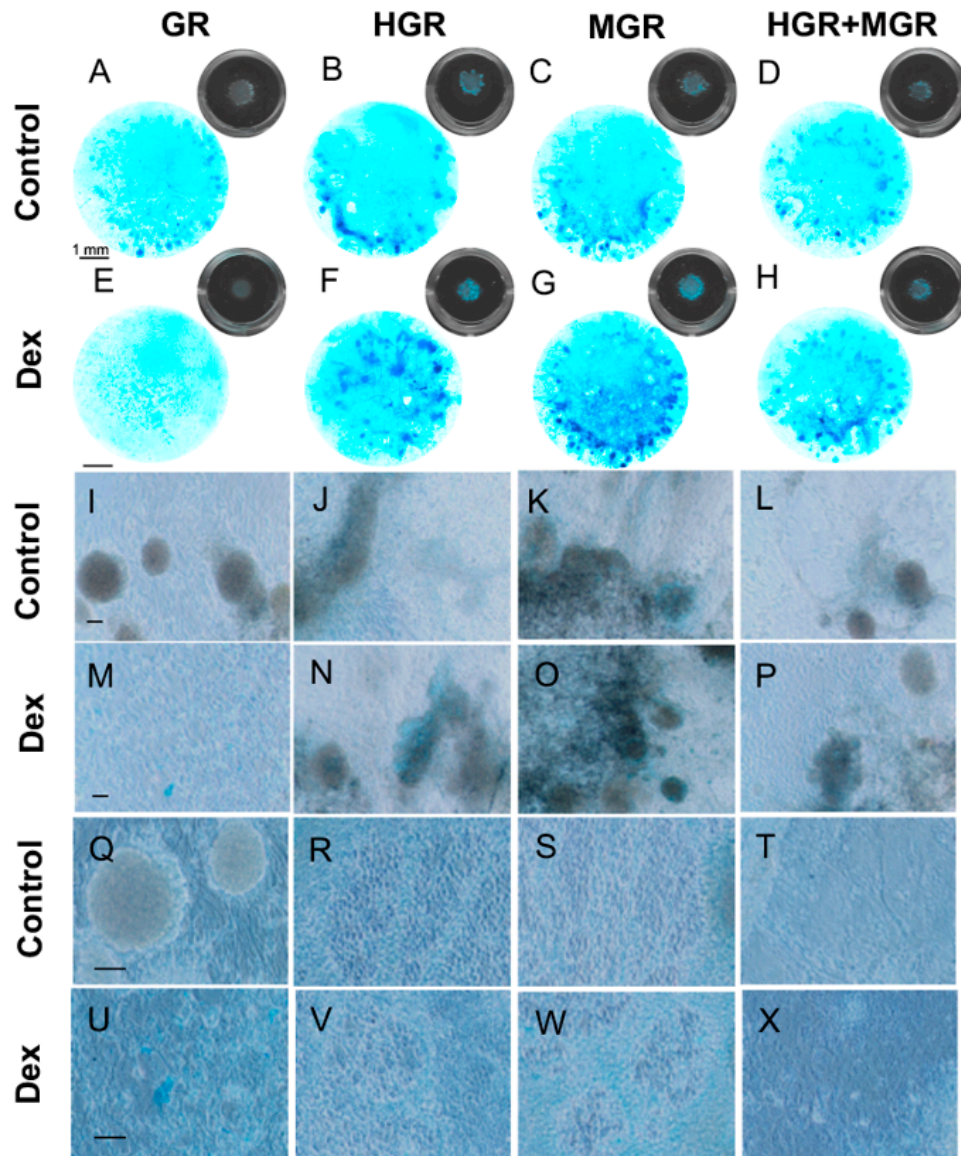
**Figure 8.** Activation of HGR and MGR nuclear translocation in double transgenic cells increases the number of differentiated  $\beta$ -TUBULIN III- and  $\alpha$ -SMA-positive cells. Cells were differentiated under control conditions or with 10  $\mu$ M Dex for 10 days and immuno-stained with anti- $\beta$ -TUBULIN III antibody (A). (B) Quantification of the number of  $\beta$ -TUBULIN III<sup>+</sup> cells. Double-transgenic cells produced a higher proportion of neurons compared with GR, MGR, or HGR cells. (C) Immunostaining with anti- $\alpha$ -SMA antibody after differentiation under control and dexamethasone-added conditions. (D) Quantification of large  $\alpha$ -SMA-positive cells with a filamentous aspect. Double-transgenic cells produced a higher proportion of smooth muscle cells compared with GR and MGR cells. Experiments were performed in triplicate; pictures were taken in at least ten fields from three independent experiments. The mean  $\pm$  SEM is presented. Statistical analysis of all conditions was conducted with ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test and only the significant differences are indicated in the graph. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 2.7. Activation of MGR and Double-transgenic Cells Increases Chondrocyte Differentiation.

Immunostaining of cells stimulated to differentiate to NC for 10 days, with or without Dex, revealed a significant increase in COL2A1-positive cells in HGR+MGR transgenic cells, after activation of both transcription factors (Figure 9). To analyze if chondrogenic differentiation can proceed further, cells were differentiated on PA6 cells for 8 days and replated as micromass cultures in differentiation medium without chick embryo extract (Figure 1) [34]. These cultures were subjected to Alcian blue staining to reveal proteoglycan characteristic of extracellular matrix produced by chondrocytes. After 3 days, no positive cells were detected, regardless of Dex addition. After 10 days all cell lines showed a few blue cells in the absence of Dex, and activation of MSX-1 clearly increased the proportion of Alcian blue-positive cells. Furthermore, blue aggregates of cobblestone-like cells were more abundant in MGR cells stimulated with Dex (Figure 10).



**Figure 9.** Activation of HGR and MGR nuclear translocation in double transgenic cells increases the number of differentiated COL2A1-positive cells. Cells were differentiated under control conditions or with 10  $\mu$ M Dex for 10 days and immuno-stained with anti-COL2A1 antibody (A). (B) Quantification of the number of COL2A1<sup>+</sup> cells. Double-transgenic cells produced a higher proportion of chondrocytes compared with stimulated GR, MGR, or HGR cells as well as unstimulated double transgenic cells. The mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments is presented. Statistical analysis of all conditions was conducted with ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test and only the significant differences are indicated in the graph. The scale bars represent 100  $\mu$ m \*\*\*  $p < 0.001$ , and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



**Figure 10.** Activation of MSX-1 increases the proportion of Alcian blue-positive cells in micromass cultures. Cells were differentiated on PA6 cells for 8 days and replated as micromass aggregates for 10 additional days. In control conditions (A–D, I–L and Q–T), all cell lines presented a few Alcian blue-positive aggregates. The proportion of blue cells clearly increased after Dex addition (E–H, M–P and U–X), especially in MGR cells (G,O,W). Blue aggregates of cobblestone-like cells suggest the presence of chondrocytes (R,S,W), with larger cells that might correspond to hypertrophic chondrocytes (T,X) in the HGR + MGR cells. The black inset (A–H) show the well of the 24-well plate with the micromass growing on the center. The scale bars represent 1 mm (A–H), 500  $\mu$ m (I–P) and 100  $\mu$ m (Q–X).

### 3. Discussion

In this study, we used human GR as an inducible system. We verified that *Msx1* and *Hes1* fused to GR responded to Dex addition by nuclear translocation. Stable transgenic mESC lines containing GR, HGR, MGR, or HGR+MGR were generated, maintained the expression of pluripotency-associated markers, and responded to a differentiation protocol for NC induction. After differentiation of the

transgenic cell lines to obtain neural crest derivatives and treatment with Dex to induce nuclear translocation of the transcription factors during the differentiation progress, we found the following:

(1) Nuclear translocation of HES-1 and MSX-1 in double-transgenic cells significantly increased expression of *Sox10*, as well as differentiation to neurons and smooth muscle cells by augmenting the number of cells positive for  $\beta$ -TUBULIN III and Smooth Muscle Actin, respectively.

(2) Transgenic lines activated to translocate MSX-1 or HES1+MSX1 showed increased chondrogenic differentiation assessed by expression of COL2A1, immunostaining for COL2A1 or Alcian blue staining.

Hes basic Helix-Loop-Helix (bHLH) repressors encode nuclear proteins that repress transcription, and they have three conserved regions that confer transcriptional functions: the bHLH (DNA binding and region for dimerization), Orange (selection of bHLH heterodimer partners) and WRPW (represses transcription) domains [37–39]. *Hes* genes play an essential role in the development of many organs by maintaining progenitor cells and regulating binary cell fate decisions. During late neural development, HES-1 regulates an astrocyte versus oligodendrocyte fate choice in glial restricted precursors [40]. On the other hand, *Hes* genes have a role in cell cycle [28]. HES-1 has an important function in self-renewal and cell survival in multipotent neural cells in the central nervous system [41]. This transcription factor has an important role in neural development, but the role in NC induction in mammals remains unclear. We did not observe induction of further NC differentiation in HGR cells after Hes1 nuclear translocation.

It has been reported that HES-1 increases the promoter activity of  $\alpha$ -*Sma* in hepatic stellate cells [42], although previous studies reported that activation of Hes1 by juxtacrine Notch signaling did not increase  $\alpha$ -SMA protein levels in the same cell type [43]. In contrast, high levels of HES-1 inhibit the ability of MyoD to convert 10T1/2 mouse embryonic fibroblasts to muscle cells [44]. Our results show that neither activated HES-1 nor MSX-1 increased  $\alpha$ -*Sma* transcript or protein levels. However, the coactivation in HGR+MGR cells showed a significant effect, increasing the number of  $\alpha$ -SMA-positive cells and  $\alpha$ -*Sma* mRNA levels. Interestingly, a previous paper showed that upon differentiation in the presence of TGF- $\beta$  human iPSC-NC stem cells produced a Smooth Muscle lineage that expressed  $\alpha$ -*Sma*, [45]. Thus, the regulation of expression of  $\alpha$ -*Sma* seems to be dependent on the partners of Hes1 and/or the cell type.

On the other hand, there is extensive evidence that MSX-1 transcription factors have an important role in proliferation, differentiation, and NC induction during embryonic development. *Msx1* and *Msx2* are specifically required for osteogenesis in the cranial NC lineage. *Msx1* is strongly expressed in these cranial cells and plays a critical role in regulating epithelial to mesenchymal transition (EMT) during organogenesis [46,47]. *Msx1* and *Msx2* function redundantly in multiple tissues and organs during vertebrate development, including the heart. *Msx1*<sup>-/-</sup> *Msx2*<sup>-/-</sup> double-knockout mice have profound defects in the cardiac outflow tract. These defects were associated with excessive proliferation of cardiac NC cells [31]. A study with *Msx1*/*Msx2* double-null mice investigated the effect of eliminating these genes on atrioventricular cushion and valve development. The researchers demonstrated that mutant mice had impaired EMT, resulting in hypoplastic cushions and malformed valves. Interestingly,  $\alpha$ -*Sma* is expressed prior to EMT in smooth muscle cell precursors; in double-knockout animals, decreased expression of  $\alpha$ -*Sma* is reported, which can contribute to defective atrioventricular cushion formation [48]. The NC is one of the major sources of smooth cell muscle cells in blood vessels (i.e., the aorta, ductus arteriosus, common carotid, innominate and right subclavian arteries) [49–52]. Taken together, these results suggest that simultaneous activation of MSX-1 and HES-1 participate in the regulation of  $\alpha$ -*Sma* expression.

SOX proteins are candidates for participation in NC specification. They are involved in several processes during embryogenesis. Based on the amino acid sequences of the HMG domain, SOX proteins can be divided into ten subgroups. Subgroup E consists of three members (SOX8, SOX9 and SOX10) that are expressed in several developing tissues, including the NC [53]. *Sox9* is an early marker of prospective NC cells, preceding markers of migratory cells. *Sox9* is the first to be expressed, overlapping with the expression of BMP4 and *Snai2* [48,54]. *Sox10* is expressed shortly after SNAI2



and is required for the early survival and migration of NC cells, and later on for differentiation of Schwann cells and melanocytes. *Sox10* expression continues in glia development but is downregulated in other NC lineages [55].

In vivo, neural crest cells constitute a transient population that arise from the ectoderm and migrates away and differentiate into many derivatives. Early work described that multipotent NC stem cells can be isolated from the rat sciatic nerve [56] or from postmigratory cells of the mouse first branchial arch [57]; such cells can differentiate in vitro to neurons, osteoblasts, myofibroblast (positive for  $\alpha$ -SMA), and Schwann cells, even at clonal assays. This suggests that a rare niche of NC stem cells might be present in vivo, but cultured cells can present a different behavior in terms of progenitor gene expression and terminal differentiation. Supporting this notion, multipotent “crestospheres” from premigratory chick embryos express the NC genes *Sox9*, *Ets1*, *Bmp4*, and *Snai2*, as well as the neural marker *Pax6* [58]. These NC cells differentiated to neurons, melanocytes, smooth muscle cells, and chondrocytes, both in vitro and after transplantation in the head mesenchyme of chicks. Induction of the premigratory NC population from neural rosettes derived from human ESCs produced crestospheres that differentiated to neurons, melanoblasts, smooth muscle cells, and chondrocytes, but in conjunction with neurospheres positive for *Sox2*. These results highlight the differences observed when studying NC progenitors in vivo and those differentiated in vitro from ESCs. We observed significant increases in *Sox9* and *Snai1* expression after NC induction under control conditions, indicating proper NC induction of mESCs. Furthermore, in MGR and HGR+MGR cells stimulated with Dex, significant upregulation of *Sox10* was observed. This suggests that the NC progenitor state is enriched under these conditions. However, enhanced differentiation to neurons, smooth muscle, and chondrocyte-like cells was also observed, which might reflect cell populations at different stages of differentiation to NC derivatives in these cultures. To our knowledge, this is the first report that indicates that activation of HES-1 and MSX-1 in mESCs produce higher proportions of neurons, smooth muscle cells, and chondrocytes, derivatives obtained also from the differentiation of NC stem/progenitor cells, although the molecular mechanisms remain to be identified.

Previously reported evidence demonstrated that morphogens, such as BMPs, together with the transcription factor SOX9, are crucial for chondrogenesis. Wnt1-driven *Sox9* conditional knockout present defects in cartilage production in cranial structures [32]. SOX9 is the transcription factor that activates Collagen IIa (*Col2a1*) [59]. On the other hand, the *Col2a1* gene can also be controlled by *Barx2*, a homeodomain transcription factor [60]. Chondrocytes can be articular or growth plate (hypertrophic): the former give rise to cartilage and the latter provide a template on which new bone is formed, substituting hypertrophic cells. Hypertrophic chondrocytes express *Col10a1* [61].

Activation of *Msx* genes by BMP signaling can promote cartilage development. For example, exogenous BMP-7, applied to lateral mandibular region at an early stage of chick development, causes ectopic expression of *Msx1* and inhibited the formation of Meckel’s cartilage. In contrast, BMP-7 addition at later stages up-regulated *Msx1*, but the final result was increased chondrogenesis [62]. Another paper where chick embryos were transduced with BMP receptors in craniofacial structures, showed that the activation of these receptors upregulated *Msx1* and *Msx2* transcripts in regions that normally do not express these genes, causing overgrowth of cartilage elements in the head; the authors conclude that the activation of BMP receptors promotes chondrogenesis [63].

We found that MSX-1 activation in MGR cells induces upregulation of *Col2a1* transcription, as well as an increase in Alcian blue staining of micromass cultures, an effect not previously reported, but that might have interesting implications for cartilage development. In fact, the expression of *Col2a1* is a sign of chondrocyte maturation for cells differentiated from mESCs, and was observed when using a different protocol, involving embryoid bodies and cell aggregation, to produce chondrocytes [33]. Craft and coworkers used different induction protocols for the production of articular or hypertrophic chondrocytes. They described differences in morphology and Collagen2a1 protein levels: hypertrophic cells are larger and had higher levels of Collagen 2, compared to articular cells [33]. Our results indicated that in MGR cells stimulated with Dex chondrogenesis occurred by the expression of *Sox9*

and *Col2a1*. Furthermore, stimulated MGR cells replated in micromass conditions showed stronger staining for the extracellular matrix components detected by Alcian blue. Interestingly, HGR+MGR cells stimulated with Dex showed increased proportions of COLLAGEN 2A1-positive cells, larger chondrocyte-like cells and an increased, albeit non-significant, expression of the hypertrophic marker *Col10a1*, suggesting that simultaneous activation of HES-1 and MSX-1 promotes a growth plate chondrocyte-like phenotype.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Cell Culture

###### 4.1.1. NIH-3T3 Cells

The NIH-3T3 mouse embryonic fibroblast cell line (ATCC®CRL-1658™) was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM Glutamax (GIBCO®, Waltham, MA, USA), and 50 U/mL penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in gelatin-coated dishes at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

###### 4.1.2. ESCs

Mouse ESCs of the W9.5 line (gift of Diana Escalante-Alcalde Lab) were grown in Knock-Out Dulbecco's Modified Eagle Medium high-glucose (KO-DMEM) containing 15% FBS, Leukemia Inhibitory Factor (1000 U/mL), 0.1 mM nonessential amino acids, 2 mM Glutamax (GIBCO®, Waltham, MA, USA), 55 µM 2-mercaptoethanol, and 50 U/mL penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). To maintain the pluripotent state, ESCs were grown with 2i: the GSK-3β inhibitor CHIR99021 (3 µM, EMD Millipore Co., Hayward, CA, USA) and the Extracellular signal-regulated kinases (ERK) inhibitor PD0325901 (1 µM, Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA) [64].

###### 4.1.3. PA6 Cells

PA6 stromal cells (RIKEN BioResource Center) were used for their stromal cell-derived neural inducing activity. These cells were cultured in Minimum Essential Medium (α-MEM) containing 10% FBS and 50 U/mL penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). PA6 cells were cultured in gelatin-coated plates at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. To avoid nutrient depletion of the culture medium, PA6 cells were inactivated mitotically with 10 µg/mL Mitomycin C for 2 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. After 2 h, the cells were washed with PBS, harvested and maintained in culture with α-MEM until used for differentiation of mESCs.

##### 4.2. Generation of cDNA Constructs and the Inducible System

The development of hormone-inducible proteins allows accurate control of the time at which they act [65,66]. To temporally control overexpression of *Hes1* and *Msx1* and coexpression of *Hes1-Msx1*, the ligand binding domain of the human GR was amplified with the GR-Fw (SacI) 5'-GAGCTCcaagaacacctctgaaaatcctggtaac-3' and GR-Rev (XhoI) 5'-CTCGAGctgattggtgatgatttcagc-3' [15] and cloned upstream in frame (into SacI and XhoI sites) with the coding sequence of a myc-His construct. This control plasmid only expresses encoded GR and the myc-His tag. The *Mus musculus* *Hes1* ORF and *Msx1* ORF sequences were high-fidelity PCR amplified from the full-length cDNA clone ID 6478994 (cat. # MMM1013-9200434, Open BioSystems Inc., Dharmacon, Lafayette, CO, USA) using the following primers: *mHes1*-Fw (HindIII) 5'-AAGCTTatgccagctgatataatggagaaa-3'; *mHes1*-Rev (BamHI) 5'-GGATCCagttccgcccaggtctcca'; *mMsx1*-Fw (HindIII) 5'-AAGCTT atgacttctttgccactcggtg-3'; *mMsx1*-Rev (BamHI) 5'-GGATCC aagtcaggtggtacatgctgtagcc-3' and ligated into a pCR-Topo-TA vector. The amplified fragment encoded 284 amino acid residues of *Hes1*, without the stop codon, and included its three structural domains, bHLH, Orange and WRPW. *Msx1* (cDNA clone ID 4923403, cat. # MMM1013-202766935) contained the repressor domain, homeodomain (DNA binding)

and nuclear localization signal (NLS). The pTopo-*Hes1* vector and pTopo-*Msx1* vectors were cut and then directionally subcloned into HindIII and BamHI sites in the GR vector to produce the *Hes1*-GR-pcDNA3.1-myc-His construct and *Msx1*-GR was subcloned into pcDNA3.1-Hygro, as shown in Table 1. DH5 $\alpha$  cells were used to expand the plasmid, and the colonies were selected with 100  $\mu$ g/mL ampicillin. Plasmid DNA was obtained and sequenced to verify each construct.

**Table 1. Plasmid List.** Gene sequences can be found on the NCBI GenBank database.

Plasmid Name	NCBI Accession Number and Name	Vector Backbone	Reference
hGR-pcDNA3.1-myc-His	HQ692822, <i>Homo sapiens glucocorticoid nuclear receptor</i> mRNA	pcDNA3.1(+)/myc-His A <sup>TM</sup> Invitrogen	Current work
<i>mHes1</i> -hGR-pcDNA3.1-myc-His	BC051428, <i>Mus musculus hairy and enhancer of split 1</i> , mRNA	hGR-pcDNA3.1-myc-His (Current work)	Current work
<i>mMsx1</i> -hGR-pcDNA3.1-Hygro	BC016426, <i>Mus musculus homeobox 1, msh-like 1</i> , mRNA	hGR-pcDNA3.1-myc-His (Current work)	Current work

#### 4.3. Nuclear Translocation after Dexamethasone Stimulation

NIH-3T3 cells were used to express the hGR-pcDNA3.1-myc-His (GR), *Hes1*-hGR-pcDNA3.1-myc-His (HGR) or *Msx1*-hGR-pcDNA3.1-Hygro (MGR) constructs. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours before transfection, NIH-3T3 cells were cultured in DMEM without phenol red supplemented with 10% charcoal-stripped FBS to avoid activation of GR before Dex addition. Forty-eight hours after transfection, the cells were treated with 10  $\mu$ M dexamethasone (Dex; D2915, Sigm -Aldrich, Milwaukee, WI, USA) to evaluate nuclear translocation of the constructs. We stimulated the cells with Dex for 24 h, assessed nuclear translocation using specific antibodies and analyzed the staining using ImageJ program (1.51 p 22). In brief, we selected, using the freeform drawing tool, the nucleus of each cell stained with the specific antibody recognizing the 6X-His tag to identify GR and HGR translocation or anti-MSX-1/2 antibodies for MGR. After selection of the area of interest, we chose a region next to the cell that had no fluorescence, defined this as the background level, and subtracted the contribution of the background in the selected area. We then quantified the integrated density and mean gray value and used these data to calculate the corrected cell fluorescence (CCF) in the nucleus using the equation  $CCF = \text{Integrated density} - (\text{area of selected cell} \times \text{mean fluorescence of background readings})$ .

#### 4.4. Generation of Stable mESC Lines

Two-and-a-half million mESCs were electroporated separately with 3  $\mu$ g of the GR, HGR, or MGR plasmids, or with both the HGR and MGR plasmids using the Nucleofector system (Lonza, Basilea, Suiza). After electroporation, cells were cultured in KO-DMEM with LIF and 2i. Two days after electroporation, mESCs were treated with 200  $\mu$ g/mL G418 (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA) or 300  $\mu$ g/mL Hygromycin B (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA) for 10 days to select resistant clones. Clones were expanded and maintained with 100  $\mu$ g/mL G418 or 110  $\mu$ g/mL Hygromycin B in the presence of LIF and 2i before differentiation.

#### 4.5. Genotyping of the Resistant Clones

To detect integration of specific cDNA into the mouse genome, we obtained genomic DNA and evaluated the presence of human *GR*, *HGR* or *MGR* via end-point PCR using specific primers (all listed 5'-3'). For GR: Forward (Fw)-gttgagggtattgaacctgaag and Reverse (Rev)-ttcatgcatagaatccaagag; GR/myc-His: Fw-ctgacaaaactcttgattctatcg and Rev-tgaatatgcataccgggtcatcatc; *mMsx1*-GR (MGR): Fw-cctacgcaagcacaagacca and Rev-ggtaggggtgagttgtggta; *mHes1*-GR (HGR): Fw-tctacaccagcaaacagtgg and Rev-tgaatatgcataccgggtcatcatc. The amount of DNA was assessed with the following specific primers for *Gapdh* (NM\_001289726.1): Fw-atcaccatctccaggagcg and Rev-ctgcttcaccacctcttg. The confirmed clones for each construct were chosen based on the best morphology of the pluripotent

colonies. One clone per construction was analyzed: *GR (G2)*, *HGR (H5)*, *MGR (M5)* and *HGR+MGR (H+M 20)*.

#### 4.6. Neural Crest Differentiation

mESCs were harvested with Triple Xpress (Gibco), resuspended in fresh DMEM without phenol red LIF or 2i, counted, plated at  $2.5 \times 10^3$  cells/mL in 24 well-plates with mitotically inactivated PA6 cells for 8 days in differentiation medium (DMEM without phenol red, 10% charcoal-stripped FBS, 2 mM Glutamax, 0.1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and 0.1 mM 2-mercaptoethanol) [6]. According to this protocol, 0.5 nM BMP4 was added from day 5 to day 8 of differentiation and cells were replated on fibronectin-coated dishes in medium containing chick embryo extract to promote neural and smooth muscle differentiation [6,56]. We evaluated the expression of NC, neuronal and smooth muscle cell markers via RT-PCR with specific primers and by immunofluorescence with specific antibodies.

#### 4.7. Immunofluorescence Staining

NIH-3T3 fibroblasts were plated on gelatin-coated coverslips, washed three times in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde solution for 10 min, washed again three times with PBS and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 1 h. After blocking for 1.5 h with 10% normal goat serum, samples were probed with primary monoclonal mouse anti-His tag (1:400, ab18184, Abcam, Cambridge, UK) or monoclonal mouse anti-MSX-1/2 (1:500, clone 4G1, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, IA, USA) antibody at 4 °C overnight, followed by a wash and incubation with goat anti-mouse secondary antibody conjugated with Alexa 488 (1:1000, A-11001, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. After staining, the percentage of cells with nuclear staining was quantified, either as corrected cell fluorescence (CCF) in the nucleus for the anti-His tag or cells positive for MSX-1/2 in the nucleus.

mESCs were stained with specific antibodies recognizing pluripotent transcription factors, namely, monoclonal mouse anti-Oct4 (1:750, 611202, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), polyclonal rabbit-anti Sox2 (1:750, AB5603, Millipore Co., Hayward, CA, USA) and polyclonal rabbit anti-Nanog (1:1000, 500-P236, Pepro Tech, Inc. Rocky Hill, NJ, USA) antibodies. Resistant mESC clones were stimulated with Dex and assessed for neural markers using polyclonal rabbit anti-Tuj1 (anti- $\beta$ -Tubulin III, 1:1000, MRB-435P-100, BioLegend Inc, San Diego, CA, USA), monoclonal mouse anti- $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (1:400, clone1A4 A2547, Sigma-Aldrich Milwaukee, WI, USA) and monoclonal mouse anti-Col2a1 (1:200, sc-518017) antibodies. Secondary goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa-fluor 488 (1:1000, A-11001, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa-fluor 568 (1:1000, A-11011, Thermo Fisher Scientific) antibodies were used.

#### 4.8. RNA Extraction and RT-PCR

Total RNA was isolated from pluripotent and differentiated cells using TRIzol reagent (Molecular Research Center Inc, Cincinnati, OH, USA). Then, 1  $\mu$ g of RNA was reverse transcribed using 10 mM dNTPs (Promega, Madison, WI, USA), 100 U of Superscript III Reverse Transcriptase, and 500 ng of oligo (dT) 12-18 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to produce cDNA. PCR reactions were performed using 300 ng of cDNA, 2 U of recombinant *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 20 pmol of each oligonucleotide, dNTPs (Promega, Madison, WI, USA), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 0.5  $\mu$ M of the following specific primers. For *Hes1* (NM\_008235): Fw-tctacaccagcaacagtgg and Rev-tcaaacatcttggcatcac; *Msx1* (NM\_010835.2): Fw-cctgaaaccaggcaggactt and Rev-ggatgcttgagagccagaa; *Snai1* (NM\_011427): Fw-gtggaaaggccttctctaggc and Rev-cagactcttggtgcttgg; *Sox9* (NM\_011448): Fw-agctcaccagaccctgagaa and Rev-ccagcaatcgttacctc; *Sox10* (NM\_011437): Fw-gcaggaagggttaggtagg and Rev-gcggagaaggatcagagtg. PCR products were analyzed via electrophoresis to determine their molecular weights after ethidium bromide staining. Reactions with RNA in the absence of retro-transcription were included as negative controls. The housekeeping genes  $\beta$ -Actin (NM\_007393)

(Primers: Fw-gggtcagaaggattcctatg and Rev-ggtctcaaacatgatctggg) and *Gapdh* (NM\_001289726.1) (Primers: Fw-ataccatcttcaggagcg and Rev-cctgcttcaccacttcttg) were used to normalize the gene expression levels. The expression of neural and NC markers was evaluated in GR, HGR, MGR, and HGR+MGR cell lines after induction of nuclear translocation by Dex, and the results were compared to the condition without Dex.

#### 4.9. qPCR

Real-time polymerase chain reaction (PCR) was carried out using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The primer concentration was 0.3  $\mu$ M. Forty reaction cycles were performed followed by melt curves to confirm the specificity of the primer sets. Three biological replicates were measured. We used the following specific primers. For  *$\alpha$ -Sma/Acta2* (NM\_007392.3): Fw-ctaaggccaaccgggagaaa and Rev-agtccagcacaataccagtgtg;  *$\beta$ -Tubulin III* (NM\_023279.2): Fw-ggcctctctcacaagtatgt and Rev-tgccagcaccactctgac; *Col2a1* (NM\_001113515.2): Fw-gaaggtgctcaaggttctcg and Rev-ctccaggaataccatcagtc; *Nanog* (NM\_028016.3): Fw-tatctggtgaacgcatctgg and Rev-ctgctcgcctcataactc; *Oct4* (NM\_001252452.1): Fw-gggctagagaaggatgtgggt and Rev-ggaaaagggactgagtagagtgtgg; *Pax6* (NM\_001244198.2): Fw-caccagactcacctgacacc and Rev-cgaatacgggctctgagaa; *Sox1* (NM\_009233.3): Fw-atgatgcaggaggcacagc and Rev-ccatgcaccgctacgacat; *Sox2* (NM\_011443.4): Fw-gccatgaacggctggagcaacg and Rev-tgctgagtaggacatgctgtagg; *Col2a1* (NM\_001113515.2) Fw-gaaggtgctcaaggttctcg and Rev-ctccaggaataccatcagtc; *Col10a1* (NM\_009925.4) Fw-caatggcagcagcattacg Rev-gcgtgcccgttcttatacagg; *AggreCAN* (NM\_007424.3) Fw-ccttctccagcttcttgagc and Rev-ggcagtggactgtctcagg; for normalization, we used the housekeeping gene  *$\beta$ -Actin* (NM\_007393): Fw-gggtcagaaggattcctatg and Rev-ggtctcaaacatgatctggg.

#### 4.10. Micromass Culture

After 8 days of differentiation in stromal PA6 cells, cells were harvested and counted. Micromass cultures were obtained by pipetting a 10  $\mu$ L droplet ( $2 \times 10^5$  cells) of cell suspension in 24-well plates. Following a 3 h attachment period without medium, differentiation medium was gently added, and changed every other day. The day of plating in micromass culture was designated as day 0. Starting on day 1, the culture medium was changed, and dexamethasone or vehicle was added, as indicated in Figure 1. After 3 or 10 days, micromass cultures were rinsed twice with PBS and fixed with Khale solution for 20 min at room temperature. This solution was substituted by 0.5% Alcian blue solution in 0.1 N HCl. After two days of staining, cultures were washed two times with 0.1 N HCl for 5 min. The cultures were stored in PBS until microphotography analysis [67]. The images of each well were digitalized by a color scanner (Hp Deskjet Ink Advantage 2135, Palo Alto, CA, USA), and are shown as insets for each condition. The microscopic pictures were acquired with an inverted microscope (Nikon DIAPHOT, Minato, Tokyo, Japan) and digitalized to 8 bits. These images were further processed to subtract background and to add the “Cyan hot” filter, using the open access program Fiji (Figure 10 A–H). Higher magnifications images were acquired with a Nikon eclipse TE2000-U inverted microscope and minimally adjusted for brightness and contrast (Figure 10 I–X).

#### 4.11. Statistical Analysis

Experiments were performed in triplicate with at least 3 independent replicates. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. One-way or two-way ANOVA was applied followed by Tukey's multiple comparison test. *p* values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

## 5. Conclusions

Altogether, our results show that the activation of two key genes that have been demonstrated to be pivotal in the development of multiple lineages in chick, mouse, and frog embryos has an effect on differentiation of the generated mESC lines into NC cells. Most protocols for NC differentiation of

ESCs require several exogenous cell signaling molecules to facilitate differentiation into NC-derived cells [68]. Remarkably, in this work, the lineages obtained were differentiated through activation of the HES-1 and MSX-1 transcription factors in addition to the extracellular stimulation. It is tempting to speculate that these differentiated  $\alpha$ -SMA-expressing cells will provide a valuable in vitro model to gain insights into the genes and pathways involved in the formation of smooth muscle cells for research in vascular development. Vascular smooth cells are neural crest derivatives, a cell population which is important in physiological and pathological processes that are not yet completely understood (i.e., the neurocristopathies CADASIL and Alagille syndromes) [1]. On the other hand, MGR cells might be used to produce chondrocytes at higher efficiencies, another NC-derived cell type which is highly relevant for craniofacial development

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/4025/s1>.

**Author Contributions:** Conceived and designed the experiments: I.V., M.J.A., and K.M.-M. Performed the experiments: K.M.-M. and G.V.-L. Analyzed the data: K.M.-M., I.V., and M.J.A. Contributed reagents/materials/analysis tools: I.V., M.J.A., and S.C.-C. Wrote the paper: K.M.-M., I.V., and M.J.A.

**Funding:** This research was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) grant numbers 131281 and 256092, by Red Temática de Células Troncales y Medicina Regenerativa and Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Papiit) grant number IN208713/IN213716 to IV, by the ANPCyT-Foncyt grant numbers PICT2013-1686 and PICT2015-1207, and CIUNT (PIUNT) grant numbers 26/D506 and PIUNT2018 26/D605 to M.J.A. Proyecto de Colaboración Científica “Diferenciación de células troncales embrionarias a derivados de la cresta neural por expresión ectópica de factores transcripcionales”. Conicet (Argentina)—Conacyt (México), Conicet 962/07 to I.V. and M.J.A.

**Acknowledgments:** We thank Erika Sánchez and Itzel Escobedo-Avila for technical support, Jesús Chimal-Monroy and Jessica Marín-Llera for advice on micromass cultures and alcian blue staining This article is part of the requirements for obtaining the Ph.D. degree of Karla Méndez-Maldonado in the program Doctorado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## Abbreviations

BMP	Bone morphogenetic protein
COL2A	Collagen type II alpha 1 chain
Dex	Dexamethasone
ESC	Embryonic stem cells
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
GR	Glucocorticoid binding domain
HES-1	Hairy and enhancer of split 1
HGR	Hes1-GR
LIF	Leukemia inhibitory factor
MSX-1	Muscle-segment homeobox 1-like
MGR	Msx1-GR
NC	Neural crest
NIH-3T3	Mouse embryo fibroblast cell line
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth muscle actin

## References

1. Vega-Lopez, G.A.; Cerrizuela, S.; Tribulo, C.; Aybar, M.J. Neurocristopathies: New insights 150 years after the neural crest discovery. *Dev. Biol.* **2018**. [CrossRef] [PubMed]
2. Vega-Lopez, G.A.; Cerrizuela, S.; Aybar, M.J. Trunk neural crest cells: Formation, migration and beyond. *Int. J. Dev. Biol.* **2017**, *61*, 5–15. [CrossRef] [PubMed]

3. Simões-Costa, M.; Bronner, M.E. Insights into neural crest development and evolution from genomic analysis. *Genome Res.* **2013**, *23*, 1069–1080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bronner, M.E.; LeDouarin, N.M. Development and evolution of the neural crest: An overview. *Dev. Biol.* **2012**, *366*, 2–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mayor, R.; Theveneau, E. The neural crest. *Development* **2013**, *140*, 2247–2251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mizuseki, K.; Sakamoto, T.; Watanabe, K.; Muguruma, K.; Ikeya, M.; Nishiyama, A.; Arakawa, A.; Suemori, H.; Nakatsuji, N.; Kawasaki, H.; et al. Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5828–5833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Basch, M.L.; Bronner-Fraser, M.; García-Castro, M.I. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature* **2006**, *441*, 218–222. [[CrossRef](#)]
8. Hong, C.-S.; Park, B.-Y.; Saint-Jeannet, J.-P. Fgf8a induces neural crest indirectly through the activation of Wnt8 in the paraxial mesoderm. *Development* **2008**, *135*, 3903–3910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Aybar, M.J.; Mayor, R. Early induction of neural crest cells: Lessons learned from frog, fish and chick. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12*, 452–458. [[CrossRef](#)]
10. Aybar, M.J.; Nieto, M.A.; Mayor, R. Snail precedes slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the *Xenopus* neural crest. *Development* **2003**, *130*, 483–494. [[CrossRef](#)]
11. Aybar, M.J.; Glavic, A.; Mayor, R. Extracellular signals, cell interactions and transcription factors involved in the induction of the neural crest cells. *Biol. Res.* **2002**, *35*, 267–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Barembaum, M.; Bronner-Fraser, M. Early steps in neural crest specification. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2005**, *16*, 642–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Liem, K.F.; Tremml, G.; Roelink, H.; Jessell, T.M. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **1995**, *82*, 969–979. [[CrossRef](#)]
14. Selleck, M.A.; García-Castro, M.I.; Artinger, K.B.; Bronner-Fraser, M. Effects of Shh and Noggin on neural crest formation demonstrate that BMP is required in the neural tube but not ectoderm. *Development* **1998**, *125*, 4919–4930. [[PubMed](#)]
15. Streit, A.; Stern, C.D. Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: Involvement of FGF and BMP activity. *Mech. Dev.* **1999**, *82*, 51–66. [[CrossRef](#)]
16. Vega-López, G.A.; Bonano, M.; Tribulo, C.; Fernández, J.P.; Agüero, T.H.; Aybar, M.J. Functional analysis of *Hairy* genes in *Xenopus* neural crest initial specification and cell migration. *Dev. Dyn.* **2015**, *244*, 988–1013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kawasaki, H.; Mizuseki, K.; Nishikawa, S.; Kaneko, S.; Kuwana, Y.; Nakanishi, S.; Nishikawa, S.I.; Sasai, Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **2000**, *28*, 31–40. [[CrossRef](#)]
18. Kawaguchi, J.; Nichols, J.; Gierl, M.S.; Faial, T.; Smith, A. Isolation and propagation of enteric neural crest progenitor cells from mouse embryonic stem cells and embryos. *Development* **2010**, *137*, 693–704. [[CrossRef](#)]
19. Aihara, Y.; Hayashi, Y.; Hirata, M.; Ariki, N.; Shibata, S.; Nagoshi, N.; Nakanishi, M.; Ohnuma, K.; Warashina, M.; Michiue, T.; et al. Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture. *Int. J. Dev. Biol.* **2010**, *54*, 1287–1294. [[CrossRef](#)]
20. Huang, M.; Miller, M.L.; McHenry, L.K.; Zheng, T.; Zhen, Q.; Ilkhanizadeh, S.; Conklin, B.R.; Bronner, M.E.; Weiss, W.A. Generating trunk neural crest from human pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19727. [[CrossRef](#)]
21. Buitrago-Delgado, E.; Nordin, K.; Rao, A.; Geary, L.; LaBonne, C. Shared regulatory programs suggest retention of blastula-stage potential in neural crest cells. *Science* **2015**, *348*, 1332–1335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Leung, A.W.; Murdoch, B.; Salem, A.F.; Prasad, M.S.; Gomez, G.A.; Garcia-Castro, M.I. WNT/ $\beta$ -catenin signaling mediates human neural crest induction via a pre-neural border intermediate. *Development* **2016**, *143*, 398–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mead, T.J.; Yutzey, K.E. Notch pathway regulation of neural crest cell development in vivo. *Dev. Dyn.* **2012**, *241*, 376–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Noisa, P.; Lund, C.; Kanduri, K.; Lund, R.; La, H. Notch signaling regulates the differentiation of neural crest from human pluripotent stem cells. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 2083–2094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Endo, Y.; Osumi, N.; Wakamatsu, Y. Bimodal functions of Notch-mediated signaling are involved in neural crest formation during avian ectoderm development. *Development* **2002**, *129*, 863–873. [[PubMed](#)]
26. Glavic, A.; Silva, F.; Aybar, M.J.; Bastidas, F.; Mayor, R. Interplay between Notch signaling and the homeoprotein Xiro1 is required for neural crest induction in *Xenopus* embryos. *Development* **2003**, *131*, 347–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ishibashi, M.; Ang, S.L.; Shiota, K.; Nakanishi, S.; Kageyama, R.; Guillemot, F. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 3136–3148. [[CrossRef](#)]
28. Kageyama, R.; Ohtsuka, T.; Kobayashi, T. The Hes gene family: Repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* **2007**, *134*, 1243–1251. [[CrossRef](#)]
29. Tribulo, C.; Aybar, M.J.; Nguyen, V.H.; Mullins, M.C.; Mayor, R. Regulation of *Msx* genes by a *Bmp* gradient is essential for neural crest specification. *Development* **2003**, *130*, 6441–6452. [[CrossRef](#)]
30. Ichiro, S.; Richard, M. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature* **1994**, *7*, 362–369.
31. Ishii, M. Combined deficiencies of *Msx1* and *Msx2* cause impaired patterning and survival of the cranial neural crest. *Development* **2005**, *132*, 4937–4950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Mori-Akiyama, Y.; Akiyama, H.; Rowitch, D.H.; de Crombrughe, B. *Sox9* is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9360–9365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Craft, A.M.; Ahmed, N.; Rockel, J.S.; Baht, G.S.; Alman, B.A.; Kandel, R.A.; Grigoriadis, A.E.; Keller, G.M. Specification of chondrocytes and cartilage tissues from embryonic stem cells. *Development* **2013**, *140*, 2597–2610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chimal-Monroy, J.; Montero, J.A.; Gañan, Y.; Macias, D.; Garcia-Porrero, J.A.; Hurle, J.M. Comparative analysis of the expression and regulation of *Wnt5a*, *Fz4*, and *Frzb1* during digit formation and in micromass cultures. *Dev. Dyn.* **2002**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kalmar, T.; Lim, C.; Hayward, P.; Muñoz-Descalzo, S.; Nichols, J.; Garcia-Ojalvo, J.; Arias, A.M. Regulated fluctuations in *Nanog* expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. *PLoS Biol.* **2009**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Boyer, L.A.; Tong, I.L.; Cole, M.F.; Johnstone, S.E.; Levine, S.S.; Zucker, J.P.; Guenther, M.G.; Kumar, R.M.; Murray, H.L.; Jenner, R.G.; et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **2005**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Dawson, S.R.; Turner, D.L.; Weintraub, H.; Parkhurst, S.M. Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 6923–6931. [[CrossRef](#)]
38. Taelman, V.; Van Wayenbergh, R.; Sölter, M.; Pichon, B.; Pieler, T.; Christophe, D.; Bellefroid, E.J. Sequences downstream of the bHLH domain of the *Xenopus* hairy-related transcription factor-1 act as an extended dimerization domain that contributes to the selection of the partners. *Dev. Biol.* **2004**, *276*, 47–63. [[CrossRef](#)]
39. Seon, A.K.; Jea, H.S.; Kim, J. The conserved WRPW motif of *Hes6* mediates proteasomal degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *332*, 33–36. [[CrossRef](#)]
40. Wu, Y.; Liu, Y.; Levine, E.M.; Rao, M.S. *Hes1* but not *Hes5* regulates an astrocyte versus oligodendrocyte fate choice in glial restricted precursors. *Dev. Dyn.* **2003**, *226*, 675–689. [[CrossRef](#)]
41. Nichane, M.; Ren, X.; Souopgui, J.; Bellefroid, E.J. *Hairy2* functions through both DNA-binding and non DNA-binding mechanisms at the neural plate border in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **2008**, *322*, 368–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zhang, K.; Zhang, Y.Q.; Ai, W.B.; Hu, Q.T.; Zhang, Q.J.; Wan, L.Y.; Wang, X.L.; Liu, C.B.; Wu, J.F. *Hes1*, an important gene for activation of hepatic stellate cells, is regulated by *Notch1* and *TGF-beta/BMP* signaling. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 878–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Chen, S.; Xu, L.; Lin, N.; Pan, W.; Hu, K.; Xu, R. Activation of *Notch1* signaling by marrow-derived mesenchymal stem cells through cell-cell contact inhibits proliferation of hepatic stellate cells. *Life Sci.* **2011**, *89*, 975–981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sasai, Y.; Kageyama, R.; Tagawa, Y.; Shigemoto, R.; Nakanishi, S. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev.* **1992**, *6*, 2620–2634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



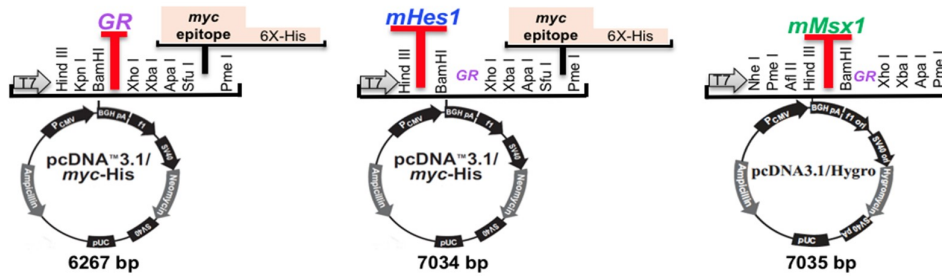
45. Wang, A.; Tang, Z.; Li, X.; Jiang, Y.; Tsou, D.A.; Li, S. Derivation of Smooth Muscle Cells with Neural Crest Origin from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells Tissues Organs* **2012**, *195*, 5–14. [[CrossRef](#)]
46. Robert, B.; Sassoon, D.; Jacq, B.; Gehring, W.; Buckingham, M. Hox-7, a mouse homeobox gene with a novel pattern of expression during embryogenesis. *EMBO J.* **1989**, *8*, 91–100. [[CrossRef](#)]
47. Han, J.; Ishii, M.; Bringas, P.; Maas, R.L.; Maxson, R.E.; Chai, Y. Concerted action of Msx1 and Msx2 in regulating cranial neural crest cell differentiation during frontal bone development. *Mech. Dev.* **2007**, *124*, 729–745. [[CrossRef](#)]
48. Cheung, M.; Briscoe, J. Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development* **2003**, *130*, 5681–5693. [[CrossRef](#)]
49. Bergwerff, M.; Verberne, M.E.; DeRuiter, M.C.; Poelmann, R.E.; Gittenberger-de Groot, A.C. Neural crest cell contribution to the developing circulatory system implications for vascular morphology? *Circ. Res.* **1998**, *82*, 221–231. [[CrossRef](#)]
50. Nakamura, T.; Colbert, M.C.; Robbins, J. Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system. *Circ. Res.* **2006**, *98*, 1547–1554. [[CrossRef](#)]
51. Majesky, M.W. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 1248–1258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Jiang, X.; Rowitch, D.H.; Soriano, P.; McMahon, A.P.; Sucov, H.M. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* **2000**, *127*, 1607–1616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bowles, J.; Schepers, G.; Koopman, P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* **2000**, *227*, 239–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Liu, J.P.; Jessell, T.M. A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development* **1998**, *125*, 5055–5067.
55. McKeown, S.J.; Lee, V.M.; Bronner-Fraser, M.; Newgreen, D.F.; Farlie, P.G. Sox10 overexpression induces neural crest-like cells from all dorsoventral levels of the neural tube but inhibits differentiation. *Dev. Dyn.* **2005**, *233*, 430–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Morrison, S.J.; White, P.M.; Zock, C.; Anderson, D.J. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* **1999**, *96*, 737–749. [[CrossRef](#)]
57. Zhao, H.; Bringas, P.; Chai, Y. An in vitro model for characterizing the post-migratory cranial neural crest cells of the first branchial arch. *Dev. Dyn.* **2006**. [[CrossRef](#)]
58. Kerosuo, L.; Nie, S.; Bajpai, R.; Bronner, M.E. Crestospheres: Long-term maintenance of multipotent, premigratory neural crest stem cells. *Stem Cell Rep.* **2015**. [[CrossRef](#)]
59. Bi, W.; Deng, J.M.; Zhang, Z.; Behringer, R.R.; De Crombrughe, B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 85–89. [[CrossRef](#)]
60. Meech, R.; Edelman, D.B.; Jones, F.S.; Makarenkova, H.P. The homeobox transcription factor Barx2 regulates chondrogenesis during limb development. *Development* **2005**, *132*, 2135–2146. [[CrossRef](#)]
61. Gu, J.; Lu, Y.; Li, F.; Qiao, L.; Wang, Q.; Li, N.; Borgia, J.A.; Deng, Y.; Lei, G.; Zheng, Q. Identification and characterization of the novel Col10a1 regulatory mechanism during chondrocyte hypertrophic differentiation. *Cell Death Dis.* **2014**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Mina, M.; Wang, Y.H.; Ivanisevic, A.M.; Upholt, W.B.; Rodgers, B. Region- and stage-specific effects of FGFs and BMPs in chick mandibular morphogenesis. *Dev. Dyn.* **2002**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Ashique, A.M.; Fu, K.; Richman, J.M. Signalling via type IA and type IB bone morphogenetic protein receptors (BMPR) regulates intramembranous bone formation, chondrogenesis and feather formation in the chicken embryo. *Int. J. Dev. Biol.* **2002**. [[CrossRef](#)]
64. Ying, Q.-L.; Wray, J.; Nichols, J.; Battle-Morera, L.; Doble, B.; Woodgett, J.; Cohen, P.; Smith, A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **2008**, *453*, 519–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Kolm, P.J.; Sive, H.L. Efficient hormone-inducible protein function in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **1995**, *171*, 267–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Jameson, J.L.; Hollenberg, A.N. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr. Rev.* **1993**, *14*, 203–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

67. Chimal-Monroy, J.; De León, L.D. Differential effects of transforming growth factors  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 and  $\beta$ 5 on chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Int. J. Dev. Biol.* **1997**, *41*, 91–102. [[PubMed](#)]
68. Curchoe, C.L.; Maurer, J.; Mckeown, S.J.; Cattarossi, G.; Cimadamore, F.; Nilbratt, M.; Snyder, E.Y.; Bronner-Fraser, M.; Terskikh, A.V. Early acquisition of neural crest competence during hESCs neuralization. *PLoS ONE* **2010**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

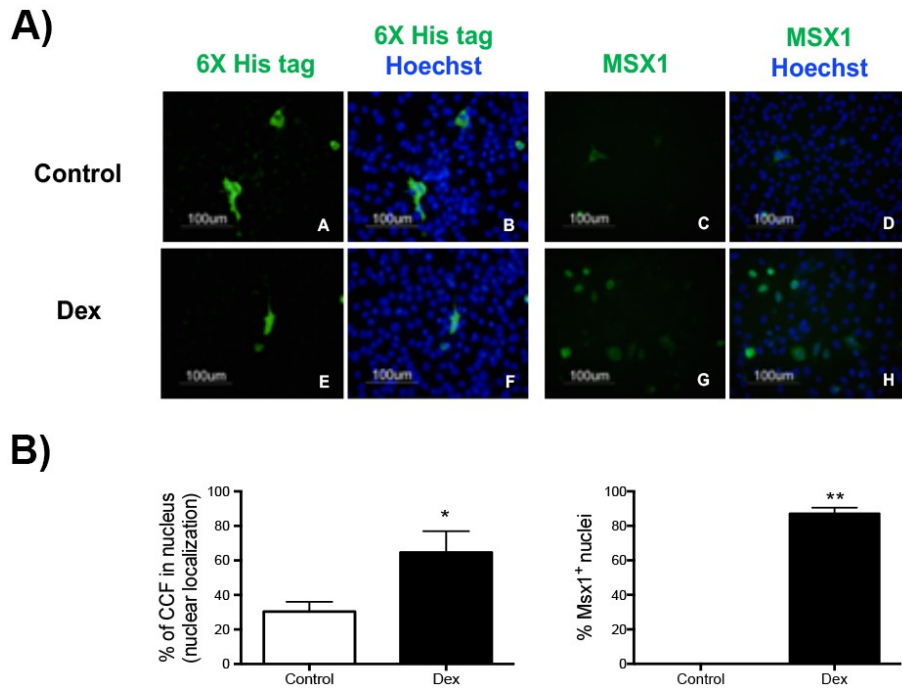


© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary information



**Figure S1. Inducible GR, *Hes1* and *Msx1* DNA constructs.** Plasmid maps depicting the insertion of GR (6267 bp) into pcDNA3.1; this vector was used to clone in-frame either *Hes1* (7034 bp) or *Msx1* (7035 bp).



**Figure S2. Transient transfection of mouse fibroblasts to verify nuclear translocation after dexamethasone addition.** (A) NIH-3T3 fibroblasts were transfected with *HGR* (left side) or *MGR* (right side) for 48 hours. Afterwards, cells were treated with 100  $\mu$ M dexamethasone, and nuclear translocation was evaluated after 24 hours using a specific 6X-His tag or *Msx1* antibody. (B) Quantification (using ImageJ) of corrected cell fluorescence of 6X-His tag staining in the nucleus of untreated cells or cells stimulated with dexamethasone. The percentage of *Msx1*-positive nuclei clearly increased after dexamethasone addition. Statistical analysis, Student's *t*-test; \* $p$  < 0.05, and \*\* $p$  < 0.01.