



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“PAPEL BIOLÓGICO DEL PÉPTIDO 4 DE LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1-p4) EN  
MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ASOCIADOS A DIFERENCIACIÓN  
CELULAR HACIA UN FENOTIPO MINERALIZANTE EN CÉLULAS MESENQUIMALES  
HUMANAS”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS

**PRESENTA**

M. EN C. SANTA RITA ARROYO CRUZ

**TUTOR**

DR. HIGINIO ARZATE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**COMITÉ TUTOR**

DR. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA – FACULTAD DE MEDICINA  
DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA – FACULTAD DE CIENCIAS



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.



## ÍNDICE

1. ABREVIATURAS .....	3
2. RESUMEN .....	4
3. ABSTRACT .....	5
4. ANTECEDENTES .....	6
4.1 Proteínas Intrínsecamente desordenadas (IDPs) .....	6
4.2 Proteína del Cemento 1 (CEMP1) .....	8
4.3 Péptido 4 de la proteína CEMP1 (CEMP1-p4) .....	11
4.4. Células Troncales derivadas de Mucosa Oral .....	14
4.5. Vías de Transducción asociadas al proceso de osteogénesis .....	14
4.5.1. Descubrimiento de la Vía Wnt/Bcatenina .....	16
4.5.2. Ligandos Wnt .....	17
4.5.3. Vía canónica .....	19
4.5.4. Vía no canónica .....	21
4.5.5. Wnt/Bcatenina y biomineralización .....	22
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	26
6. HIPÓTESIS .....	26
7. OBJETIVOS .....	27
8. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	27
9. RESULTADOS .....	36
10. DISCUSIÓN .....	53
11. CONCLUSIÓN .....	61
12. REFERENCIAS .....	62



## ABREVIATURAS

**CAP** Proteína de adhesión al cemento

**CEMP1** Proteína del cemento 1

**CEMP1-p4** Péptido 4 de la proteína del cemento 1

**CD** Dicroísmo circular

**CPC** Cloruro de cetilpiridinio

**CPPs** Péptidos de penetración celular

**DMEM** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DLS** Dispersión de luz dinámica

**EDS** espectroscopia de rayos x de energía dispersa

**FBS** Suero Bovino Fetal

**Fmoc** fluoreno metoxicarboniilo

**GAPDH** Gliceraldeído 3 fosfato deshidrogenasa

**GRAVY** Promedio general de hidropatía

**GSK3- $\beta$**  Glucogeno sintasa 3 kinasa beta

**HA** Hidroxiapatita

**HEPES** 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid

**HOMSCs** Células troncales derivadas de mucosa oral

**IBSP** Integrina sialoproteína ósea

**IDP** Proteína intrínsecamente desordenada

**LEF1** Factor de union 1 al potenciador linfoide

**MTT** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

**OCN** Osteocalcina

**OSX** Osterix

**RUNX2** Factor de transcripción óseo de unión a núcleo subunidad alfa

**RPLC** Cromatografía líquida de fase reversa

**SEM** Microscopia electronica de barrido

**SMS** metasilicato de sodio

**TCF** Factor de transcripción de células T

**Wnt** proteína de union asociadas a Wingless

## RESUMEN



El hueso es un tejido dinámico, en donde en caso de haber sufrido algún daño o se presente desgaste fisiológico se lleva a cabo un proceso de remodelación. Este proceso es indispensable como parte del mecanismo de continuo recambio requerido para funciones esqueléticas bajo las condiciones variables del medio ambiente al que está expuesto. Los osteoblastos y osteoclastos son las células principalmente involucradas en el recambio óseo. Particularmente los osteoblastos formados a partir del proceso de diferenciación celular osteogénica de células troncales mesenquimales a través de un proceso complejo de regulación de proliferación celular y diferenciación, el cual está influenciado por múltiples vías de señalización. En células troncales mesenquimales se han caracterizado las vías de transducción de BMP, Wnt y MAPK; promotoras de expresión de Runx2, Osterix y Tcf/Lef1, que están involucradas en desarrollo y mantenimiento la osteogénesis

**Objetivos.** Determinar el rol de CEMP1-p4 sobre la vía Wnt en células troncales mesenquimales humanas derivadas de mucosa bucal.

**Metodología.** Se generó la línea de células troncales mesenquimales humanas de mucosa oral. Se determinó mediante ensayos de MTT la dosis efectiva de CEMP1p4 y de LiCl, se extrajeron y cuantificaron proteínas para ensayos Western Blot y para medir expresión de  $\beta$ -catenina, GSK3 $\beta$ , Tcf/Lef1, BSP, OCN. Se extrajo y cuantificó RNA (ng/ul) para ensayos de qRT-PCR validando la expresión génica de  $\beta$ -catenina, GSK3 $\beta$ , Tcf/Lef1, BSP, OCN, OPN. Se determinó la actividad enzimática específica de fosfatasa alcalina (ALP); y la formación de nódulos mineralizados mediante tinción de Alizarina Roja. Mediante microscopía confocal se localizó celularmente a CEMP1p-4 así como la inmunolocalización celular de  $\beta$ -catenina.

**Resultados.** La dosis efectiva del péptido fue 4ug/ml y la dosis no citotóxica de LiCl fue 5mM; CEMP1p4 incrementa la expresión génica y los niveles de proteína de  $\beta$ -catenina y Tcf/Lef1 y disminuye la expresión génica y traduccional de GSK3 $\beta$ . El péptido promueve la actividad de ALP y la formación de nódulos mineralizados. CEMP1-p4 se internaliza celularmente de forma inmediata y permanece formando gránulos en la zona perinuclear. Por su parte B-catenina se trasloca al núcleo inducida por el tratamiento con el péptido.

**Conclusión.** Nuestros resultados demuestran que existe un mecanismo molecular en el que CEMP1p4 ubicado a nivel perinuclear promueve la diferenciación de células troncales derivadas de mucosa oral hacia un fenotipo osteoblástico a través de la vía de transducción Wnt/ $\beta$ -catenina



## ABSTRACT

Bone is a dynamic tissue, where remodeling occurs as part of the normal turnover or as a response upon injury. Osteoblast and osteoclasts cells are the primarily cells involved in these processes.

Particularly, osteoblasts derived from the differentiation of mesenchymal stem cells through a complex mechanism that involved multiple pathways. Among these, Wnt signaling is critical for osteoblast lineage proliferation and differentiation. The activation of this pathway occurs concomitantly with the induction of osteoblast markers and transcription factors like Runx2, Osterix and Tcf/Lef1.

**Aim:** To determine the *in vitro* role of CEMP1-p4 on Wnt signaling pathway and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells derived from buccal mucosa.

**Methodology:** We determined the effective dose of CEMP1p4 by the usage of an established Mesenchymal Stem Cell line derived from oral human mucosa. Subsequently, it was measured the gene and protein expression of Wnt and Osteoblast markers, including  $\beta$ -catenin, gsk3b, Tcf/Lef1, BSP, BMP and OCN. The induction capacity of CEMP1p4 for osteoblast lineage differentiation was evaluated through alkaline phosphatase and mineralized nodules formation assays. Finally, we determined the cellular location of CEMP1-p4 upon addition, by confocal microscopy analysis.

**Results:** The effective dose of the peptide was determined as 4 ug/uL; therefore, we used this concentration for subsequent analysis. We observed that CEMP1p4 increase both at the transcript and protein level the expression of  $\beta$ -catenin and Tcf/Lef1, while decreasing Gsk3b expression. Our differentiation assays show the capacity of Cemp1p4 to promote osteoblast differentiation. Upon addition, CEMP1p4 is internalized remaining in a perinuclear location, while promoting the granules formation. Furthermore,  $\beta$ -catenin translocate to the nucleus as a result of the treatment with the peptide.

**Conclusion:** In vitro, CEMP1p4 activates Wnt signaling promoting the differentiation of MSCs towards an osteoblast phenotype.



## ANTECEDENTES

### **Proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs)**

Las Proteínas Intrínsecamente Desordenadas (IDPs, del inglés Intrinsically Disordered Proteins) desafían el dogma de la Biología Molecular “DNA-RNA-proteína” que en términos funcionales podemos comprenderlo bajo el contexto de “secuencia-estructura-función” proteica en cuanto no poseen una estructura tridimensional definida única y compacta en solución, incluso en soluciones fisiológicas y entonces se desdibuja la relación estructura-función, al menos como ha sido definida hasta el momento. Estas proteínas no se comportan como estructuras tipo *random coil*, sino que fluctúan entre variedad de conformaciones que dependen de cada sistema. Se ha predicho que al menos el 30 % de las proteínas eucariotas son IDPs o tienen al menos un dominio que es intrínsecamente desordenado. Esto ha aumentado el interés por estas proteínas y su estudio se ha incrementado en las últimas dos décadas, mostrando que cumplen procesos celulares clave, como el ciclo celular, control de transcripción y cascadas de señalización. [1]

A finales de los años 70’s comenzaron a surgir estudios sobre la existencia de desorden estructural en proteínas y fue en 1978 cuando se encontró la primera proteína nativamente desestructurada, el glucagón monomérico que se suponía se plegaría al unirse a sus receptores. [1] La siguiente década de éstas nuevas proteínas parecían solo haber sido casos aislados y excepcionales y su aparición no reformuló para entonces el paradigma científico vigente sobre la relación estructura- función de proteínas. [4]

Al surgir técnicas mejoradas de biología molecular, la secuenciación de genes y actualmente la era postgenómica, fue posible la producción de proteínas en sistemas modelo, como bacterias o levaduras, obteniendo una mayor masa de macromoléculas, y en mejores condiciones y más puras. [3] De esta forma se obtuvieron una serie de IDPs



que pudieron ser caracterizadas más extensivamente. El estudio a mayor profundidad de las IDPs fue favorecido por la elaboración de mutantes o knockouts que demostraron que regiones desordenadas de proteínas eran vitales para la viabilidad celular o para su función. [4]

Al tener ya clasificadas un importante número de proteínas como IDPs permitió el desarrollo de métodos *in silico* de predicción de desorden estructural a partir de la secuencia. [5]

Estudios en proteómica, han demostrado que una mayor proporción de este tipo de proteínas tienen funciones regulatorias, o que sus regiones desordenadas son asociadas a promover la actividad de factores de transcripción; algunas de ellas se pliegan en procesos acoplados a la unión de sus blancos moleculares. [7]

Algunas de las propiedades que comparten las IDPs son [1] [7] [8]:

- Conformación extendida y extremadamente flexible
- Ausencia o existencia significativamente baja de estructura secundaria
- Ausencia de globularidad
- Alto volumen hidrodinámico y superficie accesible al solvente en relación al número de residuos
- Alta sensibilidad a la degradación proteolítica
- Baja complejidad de secuencia
- Alta proporción de residuos polares y cargados y consecuentemente baja proporción de residuos hidrofóbicos.
- Sesgo hacia puntos isoelectrónicos (pI) ácidos
- Puede realizar interacciones moleculares múltiples (promiscuas)





Estas proteínas y regiones son muy diferente de las proteínas y dominios ordenados en múltiples niveles.

Los IDP / IDPR tienen secuencias de aminoácidos reconocibles lo que los hace fácilmente predecibles. Son caracterizadas por la excepcional heterogeneidad espacio-temporal, que se relaciona con su notable multifuncionalidad [9] .

### **Proteína del cemento 1 (CEMP1)**

Del tejido mineralizado que rodea las raíces dentales, denominado cemento se clonaron y se caracterizaron marcadores como la proteína de cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión al cemento (CAP) [12, 13].

Estas dos proteínas han demostrado promover la proliferación y diferenciación de las células del ligamento periodontal hacia un fenotipo "similar al mineralizante" [14-16].

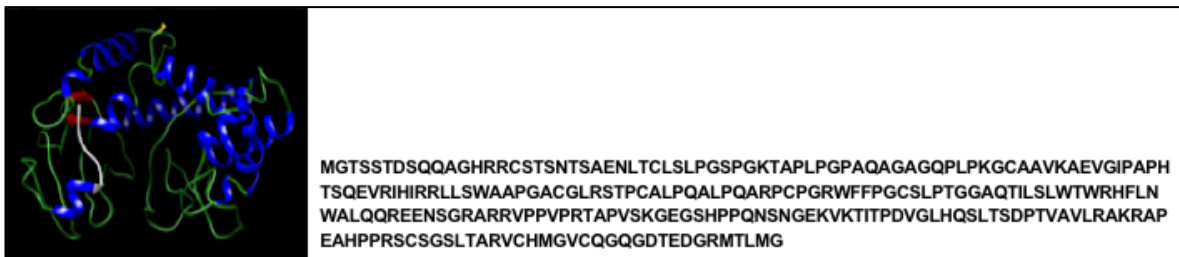
El análisis de la estructura secundaria de CEMP1 muestra que tiene una estructura enrollada al azar y se considera una proteína intrínseca desordenada (IDP).

El gen humano de la proteína del cemento 1 (CEMP1) contiene 1 exón, se extiende 1.4kb, y mapea el brazo corto del cromosoma 16 (16p 13.3). Su análisis de secuencia demuestra que está constituido por 1347 nucleótidos y tiene un ORF de 744 nucleótidos. El gen CEMP1 codifica para una proteína de 247 aminoácidos con un masa molecular teórica de 25.9 kDa, la cual después de modificaciones postraduccionales, incrementa a 50kDa. Tridimensionalmente presenta 28.6% de estructura alfa hélice, 9.9% de láminas beta y 61.5% de estructura al azar. Con base en estudios *in silico* presenta 73% de regiones intrínsecamente desordenadas (<http://globplot.embl.de/>) lo que la clasifica como una proteína intrínsecamente desordenada, que se puede observar en un modelo hipotético *in silico*. (Figura 1). Análisis físico-químicos de CEMP1 revelaron que es una proteína alcalina con un punto isoeléctrico de 9.73. Es una proteína glicosilada y en ensayos libres

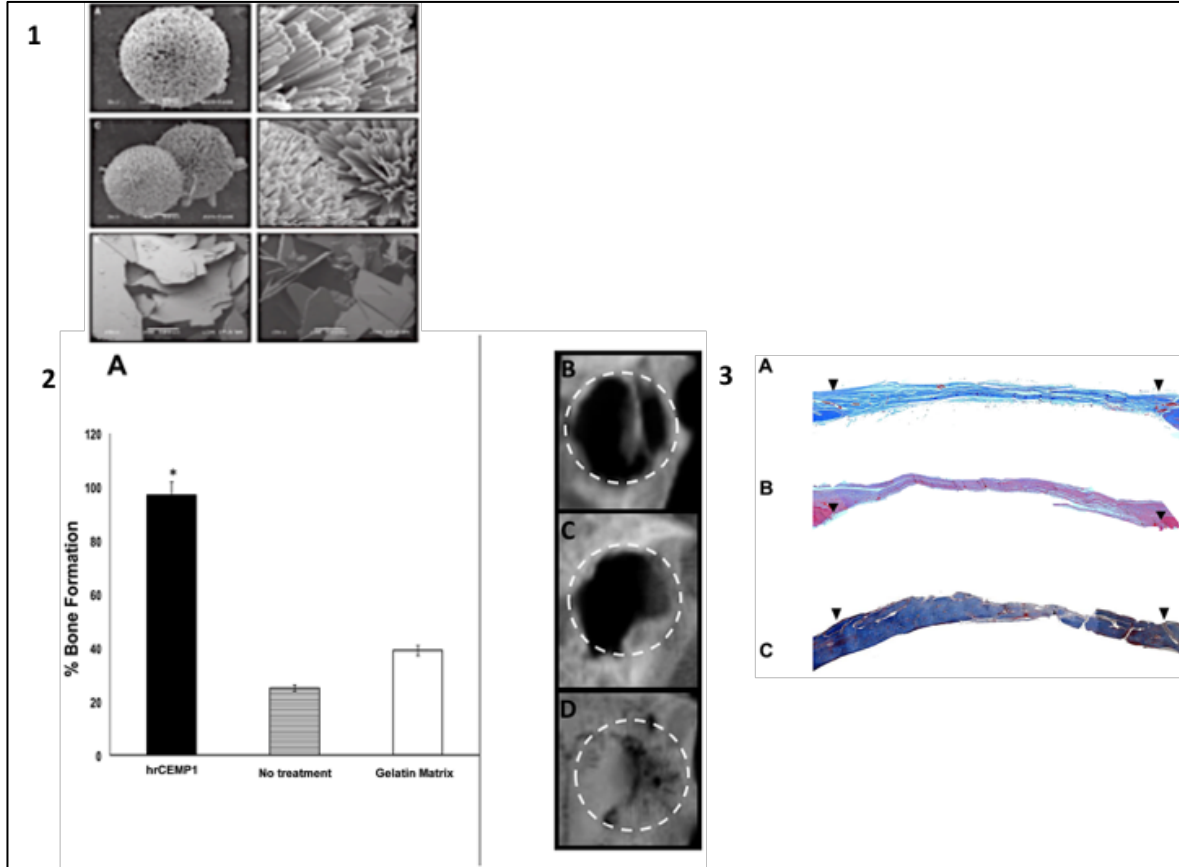


de células se ha demostrado su capacidad de nucleación, sugiriendo ser un regulador clave de la cementogénesis ya que regula la velocidad de deposición, composición y morfología de los cristales de hidroxiapatita, que pueden ser observados en la Figura 2A mediante MEB. [17]

CEMP1 humano recombinante o (hrCEMP-1) estimula la proliferación y migración células humanas del ligamento periodontal (HuPLC) y conduce a la migración de células troncales mesenquimales, lo que sugiere que esta proteína está relacionada con el mecanismo de reclutamiento perivascular de células troncales. Además, la transfección de CEMP1 en células no osteogénicas como los fibroblastos gingivales adultos humanos resultan en la diferenciación de estas células a un fenotipo de células parecidas a las mineralizantes. Estudios *in vitro*, han demostrado que es un regulador clave en el proceso de biomineralización, ya que promueve la adhesión y diferenciación celular. Induce la expresión de marcadores osteogénicos, cementogénicos y condrogénicos. En estudios *in vivo* induce la regeneración de defectos de tamaño crítico de calvaria de rata Wistar como se puede observar en la Figura 2B y 2C. [18]



**Figura 1.** Secuencia de los 247 residuos de aminoácidos que conforman a la proteína CEMP1 y modelo tridimensional hipotético *in silico* de la misma, donde se observa que corresponde a una Proteína Intrínsecamente Desordenada (IDP) con 61.5% de estructura al azar.



**Figura 2.** 1) MEB y microfotografías de cristales de hidroxiapatita formados en presencia de hrCEMP1 muestran la superficie de esférulas que tienen un origen común en el centro de la esférula. 2) Cuantificación histomorfométrica del área de la matriz ósea dentro del defecto de tamaño crítico de la calvaria de rata donde se observa que hrCEMP1 promovió la regeneración de los defectos calvariales de rata hasta en un 97% 3) Secciones histológicas teñidas con H&E muestran el defecto de tamaño crítico de calvaria de rata después de 16 semanas. (A) Defecto vacío (B) El tratamiento con andamio (C) El tratamiento con hrCEMP1, que muestra que el defecto está regenerado por tejido similar al hueso. *Tomado y modificado de Romo A. Enrique, Arzate H, Montoya A. G, Rodríguez R. Adela. High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 with lectin activity. FEBS Lett, 129-38 (Jan 2016) y de Serrano J, Romo E, Bermúdez M, Narayanan AS, Zeichner-David M, Santos L, Arzate H. Bone regeneration in rat cranium critical-size defects induced by Cementum Protein 1 (CEMP1). PLoS One. 1-10 (Nov. 2013)*

Preclínicamente en estudios *in vivo* se ha demostrado que al utilizar péptidos derivados de CEMP1 en defectos de la calvaria de rata se imitan las propiedades y capacidades biológicas y terapéuticas de la hrCEMP1, (proteína del cemento 1 recombinante humana).



Estos antecedentes comprueban que las secuencias de péptidos cortos de CEMP1 son posibles reguladores de diferenciación celular hacia un fenotipo celular "similar al mineralizante". [20, 21]

#### **Péptido 4 de la proteína CEMP1 (CEMP1-p4)**

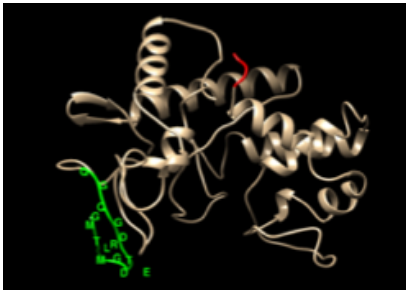
Las secuencias de péptidos cortos de CEMP1, particularmente para este estudio, el péptido 4 (CEMP1-p4), imitan las capacidades biológicas de la proteína completa CEMP1; dicho péptido es localizado en la región carboxilo terminal y tiene una estructura al azar o desordenada. Análisis del dominio carboxilo terminal de la proteína CEMP1 correspondiente a los 15 últimos aminoácidos (**QGQGDTE DGRMTLMG**) y que está localizado en una de las regiones intrínsecamente desordenadas de CEMP1, demuestra que dicha conformación es 100% azarosa. Este segmento del polipéptido se ha denominado péptido 4 (CEMP1-p4), aun cuando evidentemente no posee tridimensionalmente una estructura definida y es un péptido intrínsecamente desordenado, si es poseedor de funcionalidad en los sistemas biológicos estudiados como se observa en la Figura 3.

CEMP1-p4 estructuralmente está conformado por 80% de residuos de aminoácidos promotores del desorden estructural (EDKRGMQSP) y 20% de residuos promotores del orden estructural (WYHTFCILN); de estos residuos 20 % tienen carga negativa (DES) y 6.6% de residuos tienen carga positiva (RK) (Tabla 1). Mediante programas de predicción como Interactive threading Assembly Refinement program (I-TASSER) y Predictor of Natural Disordered Regions Program (PONDR VL-XT) <http://www.pondr.com/pondr-tut2.html> se ha determinado que CEMP1-p4 es un péptido ácido, con una hidrofobicidad



de 20.15, una índice de polaridad (GRAVY) de -1.16, un peso molecular promedio de 1595.7392 g/mol y un pI de 4.03. (Tabla 2).

Con estos antecedentes en este estudio se determinó el papel que desempeña CEMP1-p4 en la vía de señalización canónica Wnt en células mesenquimales derivadas de mucosa oral (HOMSCs) y la relación biológica asociada para inducir la diferenciación hacia un fenotipo celular mineralizante.



```
MGTSSTDSQQAGHRCSTSNNTSAENLTCLSLPGSPGKTAPLPGPAQAGAGQPLPKGCAAVKAEVGIPAPH  
TSQEVRIHIRRLLSWAAPGACGLRSTPCALPQALPQARPCPGRWFFPGCSLPTGGAQTILSLWTRHFLN  
WALQREENSGRARRVPPVPRAPVSKGEGSHPPQNSNGEKVKTITPDVGLHQSLTSDPTVAVLRRAKRAP  
EAHPPRSCSGSLTARVCHMGVCQGQGDTEGRMTLMG
```

**Figura 3.** Modelo tridimensional hipotético *in silico* de CEMP1-p4 correspondiente a los 15 últimos aminoácidos de región carboxilo terminal donde se observa que corresponde con regiones de las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPR).



MGTSSSTDSQQAGHRRRCSTNNTSAENLTCLSLPGSPGKTAPLPGPAQAGAGQPLPKGCAAVKAEVGIPIPH  
 TSQEVRIHIRLLSWAAPGACGLRSTPCALPQALPQARPCPGRWFFPGCSLPTGGAQTILSLWTRHFLN  
 WALQQREENSGRARRVPPVPRTAPVSKGEGSHPPQNSNGEKVKITITPDVGLHQSLTSDPTVAVLRKRAP  
 EAHPPRSCSGSLTARVCHMGVC **QQQGDTEdGRMTLMG**

\*Secuencia completa de la proteína CEMP1, donde se indica la región carboxilo terminal correspondiente a los 15 aminoácidos que estructuran al péptido 4 de dicha proteína

CARACTERÍSTICAS	AMINOÁCIDOS	SECUENCIA DE CEMP1-P4	PORCENTAJE DE RESIDUOS
<b>Residuos promotores del desorden estructural</b>	E- Glu- -ácido glutámico D- Asp- ácido aspártico K- Lys- lisina R- Arg- arginina G- Gly- glicina M- Met- metionina Q- Gln- glutamamina S- Ser- serina P- Pro- prolina	<b>QQQGDTEdGRMTLMG</b>	80%
<b>Residuos promotores del orden estructural</b>	W- Trp- triptófano Y- Tyr- tirosina H- His- histidina T- Thr- treonina F- Phe- fenilalanina C- Cys- cisteína I - Ile - isoleucina N- Asn- asparagnina	QQQGD <b>T</b> EDGR <b>M</b> TL <b>M</b> G	20%
<b>Residuos con carga negativa</b>	D - Asp- ácido aspártico E- Glu- ácido glutámico S- Ser- serina	QQQGD <b>T</b> EDGR <b>M</b> TL <b>M</b> G	20%
<b>Residuos con carga positiva</b>	R- Arg- arginina K- Lys - lisina	QQQGDTEdGR <b>R</b> MTLMG	6.6%

**Tabla 1.** Análisis de al secuencia de CEMP1-p4, donde se puede apreciar que el 80% de su constitución está determinada por el desorden estructural y con carga negativa. Características que sugieren que pueden ser las determinantes para las funciones biológicas que lleva a cabo.

QQQGDTEdGRMTLMG	
Característica	Valor
pI/Mw	4.03/1.59573
Longitud	15
Hidrofobicidad	20.15
GRAVY (índice de polaridad)	-1.16
PM promedio	1595.7393 g/mol
PM monoisotópico	1594.6716
pI teórico	3.7

**Tabla 2.** Valores promedio obtenidos mediante programas de predicción como Interactive threading Assembly Refinement program (I-TASSER) y Predictor of Natural Disordered Regions Program (PONDR VL-XT) nos dicen que CEMP1-p4 se caracteriza por tener residuos de aminoácidos altamente polares, que le confieren propiedades hidrofílicas.



### Células Troncales derivadas de Mucosa Oral

La mucosa bucal es un tejido que proviene de la cresta neural, que es una especialización del ectodermo- En 2010 de ella se logró aislar células troncales, así como de diferentes sitios de la cavidad oral, las cuales incluyen pulpa dental, folículo dental, germen dental, papila apical, periostio, ligamento periodontal, glándulas salivales y células derivadas del tejido adiposo. Estas células son positivas en un porcentaje mayor al 95 % a CD29, CD73, CD90, CD105 y CD166 los cuales son marcadores de MSC, como se observa en la Tabla 3 [16].

	AVG	SD
<b>MARCADORES DE CÉLULAS TRONCALES ASOCIADOS A PLURIPOTENCIA</b>		
Oct4	50.92	2.41
Sox2*	63.67	3.20
Nanog	48.04	5.16
<b>MARCADORES DE CÉLULAS TRONCALES DE CRESTA NEURAL</b>		
Snail*	98.25	1.17
Nestin*	66.44	6.64
<b>MARCADORES DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES</b>		
CD29*	94.95	1.59
CD73*	95.38	4.04
CD90*	97.17	2.40
CD105*	96.48	3.82
Stro-1	26.59	5.00
CD45	0.68	0.15

AVG (promedio) SD (desviación estándar)

**Tabla 3.** Expresión de marcadores de superficie para caracterización y confirmación de troncalidad en donde se observa que >95% de la población exprese fenotipo positivo para CD73, CD90, CD105.

### Vías de Transducción asociadas al proceso de osteogénesis

La regulación de la proliferación celular y diferenciación osteogénica es un proceso complejo, el cual es influenciado por múltiples vías de señalización. [26] La vía de señalización de BMP (bone morfogenetic protein/proteína morfogenética ósea) juega un rol necesario en la diferenciación osteoblástica y la formación de hueso postnatal, así



como en la regulación en la formación ósea que involucra un incremento en la activación de las vías de señalización BMP y Wnt (acrónimo del gen homólogo wingless “wg” y de Int-1, los cuales habían sido descritos en *Drosophila* y ratones) [27] [28].

La vía de las MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) están involucrados en la formación ósea a través de promover la actividad de mensajero así como de la proteína de Runx2 y Osx. La vía de señalización donde participa ERK 1/2 (extracelllular signal-regulated kinases) pertenece a la familia de las MAPK, la cual muestra efectos importantes durante el crecimiento celular, diferenciación celular y apoptosis. Estudios recientes muestran que ERK1/2 juegan un papel importante en células óseas, especialmente durante la proliferación y diferenciación de osteoblastos. [30]

La vía de señalización de JNK (c-Jun N-terminal Kinase) y p38 (proteína 38) juega un papel importante en la regulación de la osteogénesis. Liao et al. comprobaron que genisteína estimula la diferenciación osteoblástica a través de la activación de p38 por la vía MAPK. Guicheux y colaboradores reportaron que la vía de señalización BMP2 induce diferenciación osteoblástica a través de las proteínas JNK y p38 pertenecientes a la familia de las MAPKs.

Se ha demostrado que la proteína CEMP1 regula la expresión de proteínas que participan en la formación y maduración de tejido mineral como la fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina (OPN) y sialoproteína ósea (BSP) en cementoblastos, mediante la activación de vías de señalización caracterizadas como p-38 y JNK-MAPK; así como también participa activamente en la mineralización de la matriz extracelular de los cementoblastos.





Sin embargo el mecanismo bioquímico y molecular del rol que juega para activar dichas vías de señalización estudiados aún no ha sido dilucidado en su totalidad, requiriendo estudios adicionales para ello.

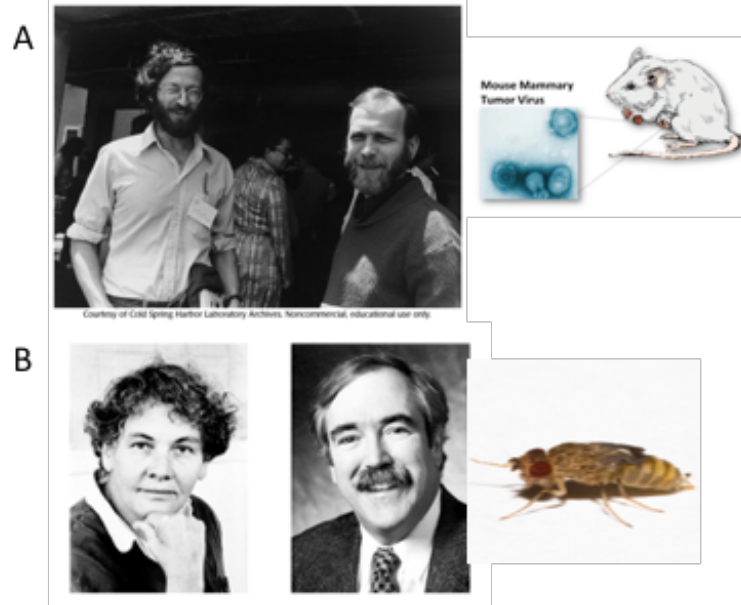
### **Descubrimiento de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina**

En 1982, Roel Nusse y Harold Varmus encontraron que el virus del tumor mamario del ratón (MMTV) promovía la carcinogénesis mamaria en ratones insertándose en un gen específico del genoma del huésped [34]. Llamaron a este gen Int-1, y sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos se obtuvieron en 1984 [35]. Más tarde, en 1987, Christiane Nüsslein-Volhard y Eric Wieschaus comprobaron que la expresión del gen homólogo de Int-1 (*wingless/gene*), provocaba la falta de alas en *Drosophila melanogaster*. En 1990 se otorgó una nueva denominación debido a las situaciones experimentales que permitieron su caracterización y los genes fueron llamados simplemente Wnt (*int-1 + wingless*). En la figura 4 podemos observar los científicos que contribuyeron al descubrimiento de esta vía de transducción. [36].

Estudios de funcionalidad genética demostraron el papel de Wnt en patrones de desarrollo y que la vía de señalización está asociada a procesos de diferenciación celular, polarización y migración durante el desarrollo.

La vía de señalización Wnt se agrupan en tres tipos: vía canónica, vía no canónica de polaridad celular y vía no canónica calcificada.

Es conocido que las Wnt pueden actuar desde cualquiera de las rutas: canónica o no canónica. Sin embargo, la determinación de cual vía es activada puede basarse en la especificidad de los receptores presentes en la membrana celular y no en la individualidad de cada ligando Wnt.



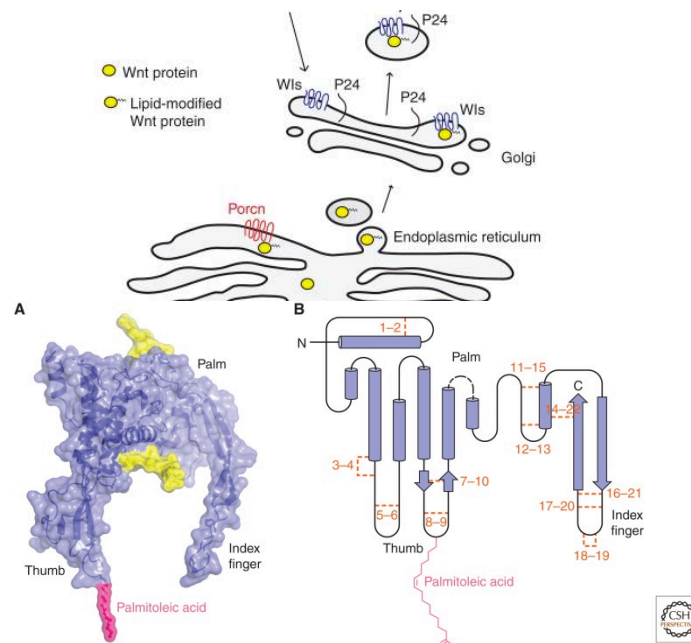
**Figura 4.** A) Nusse y Varmus en 1982 identificaron el primer gen de Wnt basado en su localización en una región cromosomal que se denominó int-1 asociada a desarrollo de cáncer mamario en ratón. B) 1987 Cristiane Nusslein Bolhard y Eric Wieschaus identificaron una región en un gen de *Drosophila melanogaster* asociado a falta en el desarrollo embrionario de la especie que provocaba que no desarrollara alas y lo denominaron Winglees. Encontraron homología entre este gen y el descrito en 1982 por lo que en 1991 la denominación de dichos genes se agrupó en un solo acrónimo llamado Wnt. Tomado y modificado de Nusse, R. & Varmus, H. *Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed.* *The EMBO journal*, doi:10.1038/emboj.2012.146 (2012).

### Ligandos Wnt

La familia de las proteínas o ligandos Wnt son glucoproteínas extracelulares conformadas por 19 miembros en ratón y humanos, como se observa en la figura 5. La secuencia primaria de aminoácidos de las Wnt sugiere que pueden ser solubles, pero al ser secretadas son hidrofóbicas y la mayoría se encuentran asociadas con la membrana celular y la matrix extracelular. La espectroscopia de masas revela que la hidrofobicidad de las Wnt se debe a que han sido modificadas por lípidos, por la adición de un palmitato en el primer residuo de cisteínas conservado y una serina en la porción media de la proteína. Aun no es claro el papel que juega la modificación lipídica de la proteína, pero se sabe que la palmitolación es necesaria para activar la ruta de señalización, modificación mostrada en la figura 5. Una posible función es servir de blanco para



dominios muy particulares ubicados en la membrana. Se sugiere que la palmitolación puede ser necesaria para la glicosilación (N-linked glycosilation) y que también puede ayudar en el transporte de Wnt entre células, así como también incrementar la interacción de Wnt con el heparán sulfato, proteoglucanos presente en la superficie de células que responden a Wnt. Alternativamente la fracción de palmitato podría anclar potencialmente las proteínas Wnt dentro de la membrana para mantener la señal.



Species	Wnt proteins
<i>Homo sapiens</i>	WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16
<i>Mus musculus</i>	Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt5B, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt8B, Wnt9A, Wnt9B, Wnt10A, Wnt10B, Wnt11, Wnt16
<i>Xenopus</i>	Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt5B, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt8B, Wnt10A, Wnt10B, Wnt11, Wnt11R
<i>Danio rerio</i>	Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt5B, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt8B, Wnt10A, Wnt10B, Wnt11, Wnt16
<i>Drosophila</i>	Wg, DWnt2, DWnt3/5, DWnt 4, DWnt6, WntD/DWnt8, DWnt10
<i>Hydra</i>	hywnt1, hywnt5a, hywnt8, hywnt7, hywnt9/10a, hywnt9/10b, hywnt9/10c, hywnt11, hywnt16

**Figura 5.** Síntesis y modificación lipídica (palmitolación) de las proteínas Wnt y los ligandos presentes en diferentes especies entre ellos los 19 correspondientes al ser humano. Tomado y modificado de Willert K. & Nusse R. *Wnt proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012. 4 (9).



## Vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina

La vía de señalización canónica Wnt/  $\beta$ -catenina, conduce a incrementar la acumulación citoplasmática de  $\beta$ -catenina que se trasloca al núcleo y activa la expresión de genes diana de Wnt [37].

El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la vía mas estudiada de Wnt y que se observa en la figura 6; ocurre en dos espacios celulares transcendentales, a nivel de membrana y a nivel citosólico. Donde en ambos casos la proteína  $\beta$ -catenina juega un rol importante [44] ya que tiene un papel clave en la vía de señalización canónica de Wnt, y es requerida para el desarrollo de tejidos orales y formación ósea. [45].

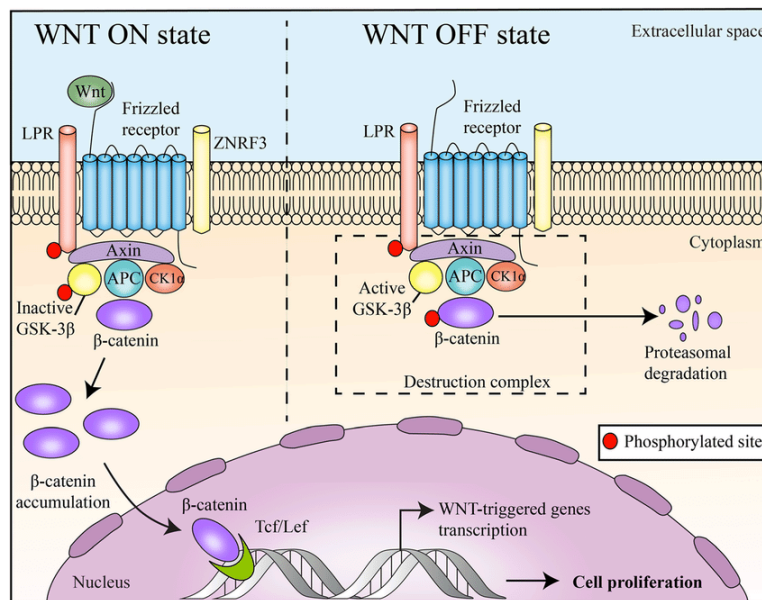
A nivel del receptor:

1. Su señal es transducida por un miembro de la familia Frizzled (FZD) una proteína de siete dominios transmembranales.
2. La formación del ligando Wnt-FZD requiere de la participación de un co-receptor miembro de las familias de lipoproteínas de baja densidad, relacionado con el receptor (LRP) que pueden ser LRP5 o LRP6.
3. La activación de la ruta de señalización de Wnt puede ser antagonizada por inhibidores extracelulares como DICKKOPF (DKK), que es secretada por la proteína parecida o relacionada con FZD (sFRP). DKK es capaz de formar un complejo con LRP5/6 el cual se asocia con la proteína transmembrana Kremen y su internalización, removiendo un componente importante de la vía Wnt ubicado en la superficie celular.
4. sFRPs contiene un dominio para FZD que lo une a las Wnt evitando que se realice una unión funcional del ligando al su receptor FZD.

A nivel del citosol:



1. Intracelularmente la señalización mediada por Wnt se manifiesta por la acumulación y movimiento de  $\beta$ -catenina hacia el núcleo celular.
2. Cuando la vía de señalización Wnt no está activa en un sistema biológico, la proteína Axina y la Adenomatous Polyposis Coli (APC) forma un complejo con la cinasa Glucógeno Sintasa 3 kinasa (GSK3) y con la cinasa caseína 1 (CK1) para fosforilar a  $\beta$ -catenina, lo que resulta en su destrucción por el proteosoma.
3. La activación del complejo receptor de Wnt promueve la inhibición de la Glucógeno Sintasa 3 Kinasa (GSK3) mediada por la proteína Disheveles (DVL) y por la breakdown del complejo de Axina.
4. Los niveles de  $\beta$ -catenina son incrementados en el citoplasma y posteriormente en el núcleo donde se forma un complejo con TCF (el Factor de Células T) y LEF (el Factor de Crecimiento Linfoide), factores de transcripción de los genes blanco de Wnt.



**Figura 6.** Vía de transducción canónica Wnt/ $\beta$ -catenina en estado inactivo  $\beta$ -catenina es degradada en el proteosoma y en estado activo debido a la unión de uno de los ligandos Wnt a su receptor,  $\beta$ -catenina se concentra en citosol para trasladarse al núcleo e inducir la transcripción de genes. Tomado de Pai, Sachin & Carneiro, Benedito & Mota, Jose Mauricio & Costa, Ricardo & Leite, Caio & Barroso-Sousa, Romualdo & Kaplan, Jason & Chae, Young & Giles, Frank. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: Modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology & Oncology*. 10. 10.1186/s13045-017-0471-6

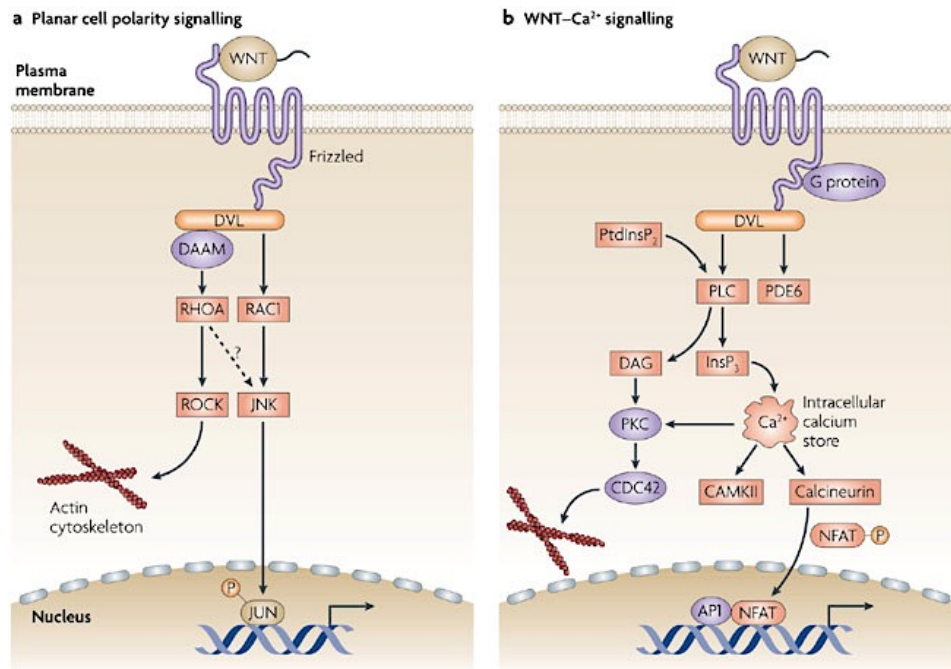


## Vía no canónica

La vía no canónica que son menos investigadas, se asocia a la ruta que regular la polaridad celular planar y la ruta de movilización de calcio. Son independientes de  $\beta$ -catenina y transducen las señales de Wnt por medio de numerosas vías de señalización como las cinasas amino terminales de unión a c-Jun (JNK). Se ha asociado esta vía a procesos como movimiento durante la gastrulación, inducción del corazón, patrón dorso ventral, separación de tejidos y migración neuronal.

La **Wnt/PCP no canónica**, también conocida como **vía Wnt/JNK**, ejemplificada en la figura 7a, es importante en varios procesos que incluyen la cicatrización de heridas [46], el correcto desarrollo del tubo neural [47], la motilidad y la modulación de la morfología celular [48]. Todos estos eventos son generados por la reorganización del citoesqueleto de actina. Algunas de las principales proteínas implicadas en la transducción de la señal extracelular generada por Wnt / PCP son vangl2, celsr1-3(49), Dvl, JNK, PKC(50), Rac y RhoA [51]. A diferencia de su contraparte canónicas esta vía es bastante diversa pues se ha reportado que puede activar el flujo de calcio a las proteínas G, a las GTPasas, a Rho y a las cinasas amino terminales de unión a c-Jun, es probable que una proteína Wnt pueda activar más de una respuesta en una célula si múltiples tipos de receptores se encuentran presentes.

En la **vía Wnt / Ca<sup>2+</sup>** observada en la figura 7b, los mensajeros secundarios, como IP3 y DAG, liberan iones calcio del retículo endoplásmico [52] y posteriormente activan CaMKII [53] y PKC. [54] Los procesos que se desencadenan por la activación de esta vía no canónica incluyen los siguientes: la regulación de los movimientos de extensión convergentes [55], la reorganización del citoesqueleto de actina [56], la modulación de la motilidad celular [57] y la contribución a la respuesta inflamatoria [58].



**Figura 7.** Vías no canónicas de Wnt. a) Vía Wnt/PCP o Wnt/JNK y b) Vía Wnt / Ca<sup>2+</sup>. Tomado de Frank J. T. Staal, Tiago C. Luis & Machteld M. Tiemessen. *WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. Nature Reviews Immunology* 8, 581-593 (August 2008)

### Wnt/ $\beta$ catenina y biomineralización

El hueso es un tejido dinámico, en donde se lleva a cabo un proceso de remodelación con el propósito de reparar aquel que ha sufrido daño o que debe ser remodelado por el desgaste fisiológico. Este proceso es indispensable como parte del mecanismo de continuo recambio requerido para funciones esqueléticas bajo las condiciones variables del medio ambiente al que está expuesto. Los osteoblastos y osteoclastos son las células principalmente involucradas en el recambio óseo, son responsables para la formación y resorción de hueso respectivamente. Particularmente, los osteoblastos formados a partir del proceso de diferenciación celular osteogénica de células troncales mesenquimales a través de un proceso regulado en diferentes etapas como lo podemos observar en la figura 8.





Como se ha descrito previamente en el presente trabajo, la vía de señalización Wnt consiste en toda una serie de proteínas secretadas que regulan diferentes procesos celulares que incluyen aspectos relevantes del metabolismo óseo. Esta familia de proteínas forma una red de señales intracelulares que funciona en combinación con otros factores como son las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), que afectan a la formación ósea. Las BMP precisan de un correcto funcionamiento del resto de componentes de la vía Wnt y viceversa, por lo que de este modo la estimulación del osteoblasto formador de hueso ocurre a modo de un proceso que interrelaciona ambos componentes, proceso que se muestra en la figura 9.

Las proteínas secretadas por la vía Wnt activan tres vías intracelulares:  $\beta$ -catenina (vía canónica), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y la vía de polaridad celular planar. La primera es la dominante en la regulación de la diferenciación del osteoblasto, mediante la interacción de  $\beta$ -catenina con los factores de transcripción del núcleo como TCF (el factor derivado de células-T) y LEF (el factor de unión al potenciador linfoide) (lymphoid enhancer-binding factor).

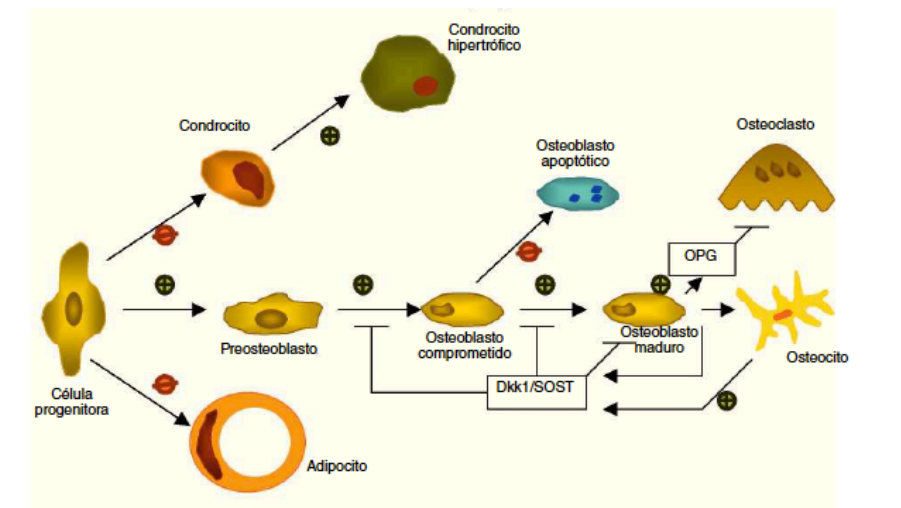
La vía canónica es necesaria para el desarrollo del diente durante interacciones epitelio-mesenquimales y formación de tejido mineralizado, lo que indica que la  $\beta$ -catenina juega un papel fundamental [59-61]. La evidencia acumulada ha demostrado cómo esta vía de coordina la pluripotencia y la autorrenovación de las células madre [16-18] [62-64]. Ésta señalización estabiliza la  $\beta$ -catenina, que se une a TCF/LEF (factor de unión al factor de células T/potenciador linfoide) y factores de transcripción, de esta manera regula la transcripción de genes diana de Wnt [65]. Sin embargo, Wnt/ $\beta$ -catenina activada no es suficiente para inducir la diferenciación osteogénica y es necesario que otros factores promotores, que cumplan un rol de estimulantes de la señalización, estén presentes. Además, se sabe poco sobre la participación de las secuencias peptídicas de CEMP1 en



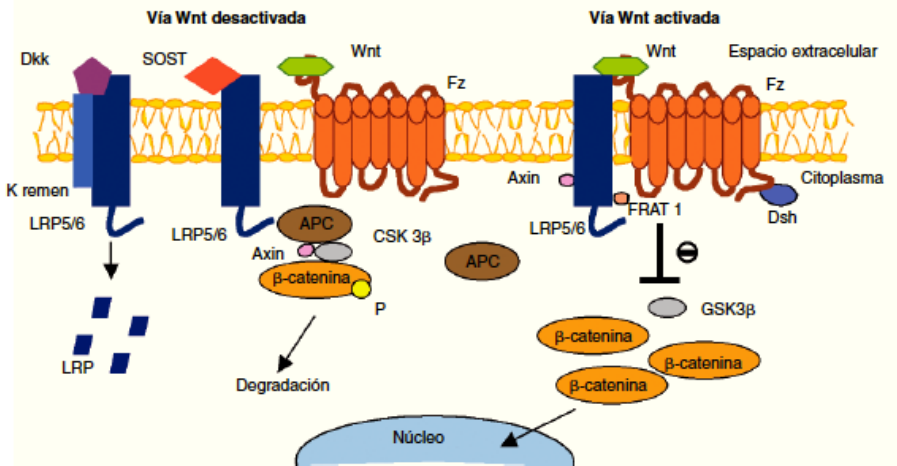


la vía de señalización canónica Wnt, como promotor en la diferenciación celular a un fenotipo celular "similar al mineralizante". Estudios previos han demostrado que el dominio C-terminal de CEMP1 posee propiedades biológicas para promover la diferenciación celular y la mineralización. [20]

Finalmente el LiCl (cloruro de litio) es un activador conocido de la vía canónica Wnt y es empleado frecuentemente como promotor para activar la señalización de Wnt/  $\beta$ -catenina. Se ha encontrado que LiCl es promotor de la proliferación de células troncales de papila apical y mesenquimales humanas.



**Figura 8.** Papel de la vía canónica de señalización Wnt como regulador de la formación y resorción ósea, que favorece la línea celular del osteoblasto mediante el control de la proliferación, diferenciación y maduración del osteocito, mientras que inhibe la diferenciación del adipocito o del condrocito desde la célula progenitora. Los osteocitos son capaces de producir Dkk1 y SOST, que ejercen un feedback negativo sobre la diferenciación y función del osteoblasto. Tomada de Baron, Roland, and Georges Rawadi. "Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton." *Endocrinology* 148.6 (2007): 2635-2643.



**Figura 9.** Vía de señalización Wnt en el osteoblasto. Cuando la vía está activada, Wnt forma un complejo con el receptor frizzled (Fz) y LRP5/6; β-catenina se disocia de una serie de cofactores (APC, Axin y GSK3β), impidiendo así su fosforilación. Los cofactores Axin, Frat1 y Dsh provocan una inhibición en la enzima glucógeno-sintetasa-quinasa (GSK3β), lo que permite alcanzar un nivel estable de β-catenina en el citosol, que es trasladada al núcleo, donde activa genes que promueven la diferenciación del osteoblasto. En la forma opuesta a la anterior, la proteína Fz no está unida al ligando Wnt y no se produce señal de activación. Tomado de Baron, Roland, and Georges Rawadi. "Targeting the Wnt/β-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton." *Endocrinology* 148.6 (2007): 2635-2643.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

El proceso de biomineralización, es considerado como un paradigma en el desarrollo de nuevas terapias para la regeneración de tejidos mineralizados perdidos por diversas patologías. El estudio al interior de la célula de los mecanismos moleculares en la regeneración de tejidos mineralizados y su regulación, aun no son claros, por lo que determinar los procesos de comunicación intracelular involucrados permitirá sentar la bases para el desarrollo y mejoramiento de las terapias de vanguardia actualmente utilizadas, como el uso de péptidos y su relevancia por ser algunos de ellos derivados de proteínas intrínsecamente desorganizadas, con el propósito de favorecer el proceso de neoformación ósea.

Se han reportado avances importantes respecto a la función del péptido de la proteína del cemento 1 (CEMP1p) en el proceso de mineralización; sin embargo, se requiere conocer a fondo los mecanismos de señalización intracelular activados por estos péptidos, para determinar de manera clara y precisa el rol que juegan, dada la trascendencia que implicaría su uso como candidatos en la terapia de regeneración ósea.

## **HIPÓTESIS**

El péptido 4 de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p4), promueve la actividad de vías de señalización intracelulares asociadas a procesos de diferenciación celular, hacia un fenotipo mineralizante en células troncales mesenquimales humanas derivadas de mucosa oral (HOMSCs)



## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el papel del péptido 4 de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p4), en la vía de transducción canónica de Wnt/B-catenina de células troncales mesenquimales humanas derivadas de mucosa oral (HOMSCs)

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar el efecto del péptido 4 de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p4), en la expresión génica y transduccional de  $\beta$ -catenina, GSK3- $\beta$  y Tcf/Lef1
- Determinar el efecto del péptido 4 de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p4), en la expresión génica y traduccional de Osterix (Osx) y Runx2.
- Determinar el efecto del péptido 4 de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p4), en la expresión a nivel transcripcional y traduccional de moléculas asociadas al proceso de biomineralización (BSP y OCN)

## **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **Síntesis del péptido 4 de la proteína CEMP1 (CEMP1-p4)**

Se sintetizó, mediante técnicas de fase sólida (Fmoc), el péptido correspondiente a los aminoácidos 233-247 (QGQGDTE DGRMTLMG: CEMP1-p4), del dominio carboxilo terminal de la proteína de cemento humana 1 (CEMP1; Acceso: NP\_001041677.1; GI: 115292438). El péptido obtenido fue purificado por cromatografía líquida de fase inversa de C-18 hasta el 95% (New England Peptide, Ipswich, MA, EE. UU.) y liofilizado. El péptido liofilizado se disolvió en agua desionizada destilada y se filtró (filtro de 0,22 mm) antes de su uso.



## **Generación de cultivo de Células Troncales Mesenquimales Humanas de Mucosa**

### **Oral (HOMSCs)**

El uso de tejido humano de la cavidad oral para la generación y cultivo de HOMSC fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de México (UNAM). Las HOMSCs se cultivaron y se mantuvieron hasta su confluencia en cajas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Nunc, Life Technologies, MX), en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) suplementado con Suero Fetal Bovino inactivado al 10% (SBF) (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU), 1% (v/v) Anti-anti, MEM NEAA, 100mM de Piruvato de Sodio en un ambiente 100% de humedad a 37°C, 95% de atmósfera de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células entre el cuarto y quinto pasaje fueron utilizadas para los procedimientos experimentales. De acuerdo a los descrito anteriormente el medio mineralizante (MM), fue adicionado con β-glicerofosfato 5 mM y ácido ascórbico (50 µg / ml).

### **Ensayo de proliferación y citotoxicidad celular para determinar dosis efectiva.**

Las HOMSCs fueron tripsinizadas (0.05% Trypsin-EDTA 1X. Gibco™, Invitrogen, MX), homogenizadas y contadas (The Countess® automated cell counter, Gibco™, Invitrogen MX). La densidad celular fue ajustada y posteriormente se sembraron en cajas de cultivo de 96 pozos (Thermo Fisher Scientific) a una densidad de 0.5 X10<sup>4</sup> células por pozo en medio DMEM 1X (Gibco™).

Se evaluaron los efectos del CEMP1-p4 y del Cloruro de Litio (LiCl) en la proliferación celular así como la dosis efectiva de tratamiento, mediante el ensayo colorimétrico con 3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) en PBS pH 7.2 filtrado a 0.2 µm.



Las células fueron tratadas experimentalmente por 0, 24, 48 y 72 horas con diversas concentraciones de CEMP1-p4 ( 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu$ g/ml ) y de cloruro de litio LiCl ( 5mM, 10mM y 20mM) en DMEM al 0.2% de SBF. El medio fue remplazado cada tercer día. Las células control en ausencia de CEMP1-p4 y de LiCl fueron mantenidas en DMEM al 10% de SBF (control positivo) y 0.2% de SBF (control negativo) respectivamente. Finalizado los intervalos de tratamiento de las células se adicionaron 10 $\mu$ l de solución de MTT (3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 5mg/ml y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Al final del periodo de incubación se removió el medio y se solubilizó el colorante convertido en formazán con 100 $\mu$ l de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, Saint Louis, MO, USA) por pozo de cultivo y se incubó durante 1 hora a 37°C, posteriormente se midió la absorbancia a 570nm en un lector de placas FilterMax™ Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA).

### **Extracción de proteínas y ensayos de Western Blot**

Las células troncales mesenquimales humanas (HOMSCs) se cultivaron en cajas de 6 pozos por triplicado a una densidad de 5X10<sup>4</sup>, para la extracción de proteínas con base en las condiciones descritas a continuación. Para los ensayos de señalización fueron: **1)** DMEM; **2)** DMEM adicionado con 4.0  $\mu$ g/ml de CEMP1-p4; **3)** DMEM adicionado con 5mM de LiCl; **4)** DMEM adicionado con 4.0  $\mu$ g/ml de CEMP1 y 5mM de LiCl. Para los ensayos de biomineralización fueron: **1)** MM (medio mineralizante )  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM, ácido ascórbico (50  $\mu$ g / ml); **2)** MM (medio mineralizante )  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM, ácido ascórbico (50  $\mu$ g / ml) adicionado con 0.4  $\mu$ g/ml de CEMP1-p4.

La dosis seleccionada fue elegida con base al ensayo dosis- respuesta de proliferación y citotoxicidad celular. Los tiempos para caracterizar la expresión proteica de las moléculas participantes en la vía Wnt- $\beta$  catenina fueron 15, 30, 60 y 120 minutos . Los tiempos para



caracterizar moléculas involucradas en procesos de biomineralización fueron 3, 7 y 14 días. Después del tiempo indicado, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS y Ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) 1mM, se rasparon las células, se resuspendieron en amortiguador para extracción de proteínas que contenía PBS 10mM y Ortovanadato de Sodio 1mM ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), con el objetivo de conservar las proteínas fosforiladas, en un ambiente frío. Se centrifugaron 10 minutos a 5,000 rpm, el botón obtenido fue resuspendido con buffer de lisis (50mM de Tris-HCl pH7.4; 150 mM NaCl, 1mM PMSF, 10mM NaF, 1% Triton-X100, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10mM de Pirofosfato de Sodio y 1 tableta de inhibidores de proteasas (Complete; Roche Diagnostics)).

El producto del lisado fue sonicado por 4 pulsos durante 15 segundos a 20% de amplitud y posteriormente centrifugado (14,000 rpm a 4°C). Se recuperó el sobrenadante para realizar la cuantificación de proteínas.

Se determinó la concentración de proteínas de acuerdo al método de Bradford utilizando BSA como proteína estándar.

Se validó la expresión de las siguientes proteínas en la fase de diferenciación por ensayos de Western Blot mediante el uso de anticuerpos primarios monoclonales anti- $\beta$ -catenina, anti-GSK3 $\beta$ , anti-Lef1 y anti-Tcf1 (Jackson Immuno Research Lab, Inc. West Grove, Pensilvania, Estados Unidos), utilizando como proteína control anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU.)

Se validó la expresión de las siguientes proteínas en la fase de biomineralización por ensayos de Western Blot, utilizando los anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-Osx, anti-Runx2, anti-IBSP, y anti-OCN; utilizando como proteína control anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU.)



Las proteínas de los grupos experimental y control (20 mg / carril) se separaron por SDS-PAGE al 12% y electrotransferencia en una membrana de PVDF. (Immobilon-P; Millipore Sigma). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% durante 1 hora y luego se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos 1: 1000 durante 1 hora, posteriormente se lavaron con PBS tres veces. Después de lavarlas, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios anti-conejo de cabra o IgG de cabra anti-ratón diluidos 1: 1000 conjugado con peroxidasa durante 1 h. Las membranas se lavaron con PBS y se desarrollaron con 3,3' diaminobenzidina (DAB)

Todas las membranas fueron digitalizadas con escáner Epson V550 y procesadas y analizadas con el software de ImageJ (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA). Los niveles de expresión relativa de cada proteína fue evaluada y medida de acuerdo a la integridad e intensidad de cada pixel de cada banda, excluyendo el ruido de fondo. Los resultados fueron expresados en porcentajes de expresión relativa.

### **Extracción de RNA y ensayos de RT-PCR**

Las células troncales mesenquimales humanas (HOMSCs) se cultivaron en cajas de 24 pozos por triplicado a una densidad de  $1 \times 10^4$ , para la extracción de RNA con base en las siguientes condiciones. Para los ensayos de señalización fueron: **1)** DMEM; **2)** DMEM adicionado con  $4.0 \mu\text{g/ml}$  de CEMP1-p4; **3)** DMEM adicionado con  $5\text{mM}$  de LiCl; **4)** DMEM adicionado con  $4.0 \mu\text{g/ml}$  de CEMP1-p4 y  $5\text{mM}$  de LiCl. Para los ensayos de biomineralización fueron: **1)** MM (medio mineralizante)  $\beta$ -glicerofosfato  $5\text{mM}$ , ácido ascórbico ( $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ ); **2)** MM (medio mineralizante)  $\beta$ -glicerofosfato  $5\text{mM}$ , ácido ascórbico ( $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) adicionado con  $0.4 \mu\text{g/ml}$  de CEMP1-p4.





Los tiempos para caracterizar la expresión génica de las moléculas participantes en la vía Wnt- $\beta$  catenina fueron 15, 30, 60 y 120 minutos. Los tiempos para caracterizar moléculas involucradas en procesos de biomineralización fueron 3, 7 y 14 días. Se realizó la extracción de RNA mediante el método de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se cuantificó el RNA (ng/ml), después de ello se realizaron los ensayos de RT-PCR utilizando 10ng de RNA por reacción, utilizando el método Super-Scrip III Platinum Sybr Green One- Step qPCR kit (Thermo Fisher Scientific). Las condiciones para una reacción de 25  $\mu$ l fueron las siguientes síntesis de cDNA a 50°C durante 3 min, la desnaturalización a 95°C durante 5 min; a partir de entonces 40 ciclos de 95°C durante 15s, 60°C durante 30s y un ciclo de mantenimiento a 40°C durante 1 min. Las reacciones se realizaron en un Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Germantown, MD, USA). Las secuencias de los primers utilizados se muestran en la tabla 4.

Gene	Primer sequence, 5' - 3'	
	Forward	Reverse
<i><math>\beta</math>-catenin</i>	GGTGCTGACTATCCAGTTG	GGCAGAGTAAAGTATTCACCC
<i>GSK3<math>\beta</math></i>	GACTTTGGAAGTGCAAAGC	AGGAAATATTGGTTGTCCTAGC
<i>Lef1</i>	GAAGAGGAGGGCGACTTAG	CTTTCCTTCATCAGGGTGTTT
<i>Tcf1</i>	CCAACATTCTCAGGTCGC	GAGCAAGCCAGGTGTTT
<i>Bsp</i>	AACGAAGAAAGCGAAGCAGAA	TCTGCCTCTGTGCTGTTGGT
<i>Ocn</i>	GTTGCAGGCTCAATCCATTT	CCATCCTCATACTGCACCT
<i>Osx</i>	GCCAGAAGCTGTGAAACCTC	GCTGCAAGCTCTCCATAACC
<i>Runx2</i>	ACCCAGAAGGCACAGACAGAAG	AGGAATCGCCCCTAAATCACT
<i>Gapdh</i>	CAACGGATTTGGTCGTATTGG	GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA

**Tabla 4.** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para ensayos RT-PCR



### **Ensayo de formación de nódulos de calcio con Alizarina Roja**

Para estudiar el efecto del péptido de CEMP1-p4 sobre las células troncales mesenquimales humanas (HOMSCs). en la inducción para la formación de nódulos de calcio, se sembraron  $5 \times 10^4$  células en placas de 24 pozos Nunc® y se mantuvieron para su adherencia durante toda la noche. Las células fueron tratadas durante 3, 7 y 14 días bajo las siguientes condiciones **1)** MM (medio mineralizante)  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM, ácido ascórbico (50  $\mu\text{g}$  / ml)DMEM; **2)** MM adicionado con 4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de CEMP1-p4; el medio fue remplazado cada dos días.

Al cumplirse cada tiempo se retiró el medio y se fijaron las células con paraformaldehído al 4% y lavados con PBS. Los nódulos de calcio fueron teñidos usando solución saturada de alizarina roja S pH 4.2 (ARS; Millipore Sigma, Burlington, MA, USA) por 10 minutos. La tinción residual se removió mediante 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS y la presencia de nódulos fue observada por microscopia de luz y analizada con ImageJ software (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA). La mineralización fue cuantificada con el método de cloruro de cetilpirimidina (CPC). La alizarina roja fue diluida en 2ml/ pozo con CPC al 10%, y la absorbancia fue leída a 570 nm ( Filter Max F5; Molecular Devices) Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Ensayo de actividad de Fosfatasa Alcalina (ALP)**

Para estudiar el efecto del péptido de CEMP1-p4 sobre las células troncales mesénquimales humanas HOMSCs en la actividad específica de la enzima Fosfatasa Alcalina (ALP), las células fueron cultivadas  $5 \times 10^4$  en cajas de 6 pozos por 4, 7 y 14 días bajo las siguientes condiciones descritas **1)** MM (medio mineralizante)  $\beta$ -glicerofosfato 5 mM, ácido ascórbico (50  $\mu\text{g}$  / ml)DMEM; **2)** MM adicionado con 4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de CEMP1-p4.



Transcurrido el tiempo, las células fueron desprendidas de las cajas de cultivo y se lisaron en 50µl de buffer de lisis (0.05mM Tris-HCl, pH7.8, 0.15 M NaCl; 1% Tritón X100, 0.5M PMSD y Complete EDTA-free; inhibidores de proteasas) y en 150µl de buffer de lavado de ALP (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl 0.1% Tween 20 pH 7.5), se sonicaron por 20 s. Se incubaron 5µl de muestra de proteína adicionada con 95µl de buffer de reacción ALP (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 1M dietanolamina, 0.25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM pNPP, pH 9.8) a 37°C por 30 minutos con p-nitrofenilfosfato (pNPP; sustrato de la fosfatasa alcalina).

La actividad enzimática de fosfatasa alcalina fue expresada en nanomoles de p-nitrofenol por minuto por miligramos de proteína y la absorbancia fue leída a 570 nm ( Filter Max F5; Molecular Devices) Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **Microscopia confocal para localización celular de CEMP1-p4**

Para determinar la internalización y la ubicación de CEMP1-p4, se sembraron HOMSC en placas a  $0.5 \times 10^3$  en portaobjetos de cámara Lab-Tek. Las células se cultivaron durante la noche y se incubaron durante 1, 15, 30, 60 y 120 min con CEMP1-p4 marcado con Alexa Fluor 546 (24) Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas utilizando un microscopio de barrido láser confocal Olympus FV1000 (Olympus America, CDMX, México) equipado con un objetivo X20. Las células de control se incubaron únicamente con Alexa 546. Las imágenes fueron analizados usando plot profile del software ImageJ.

#### **Microscopia confocal para inmuno-colocalización celular de β-catenina**

Las células fueron tratadas con CEMP1-p4 con 4µg/ml, fueron incubadas por 15, 60 y 120 minutos, después fueron fijadas en paraformaldehído al 4% por 10 minutos e incubados por toda la noche a 4°C con un anticuerpo primario monoclonal anti-β-catenina (BD



Biosciences, San Jose, CA, USA). Para el análisis de localización nuclear, las muestras fijadas se sometieron a análisis de imágenes confocales digitales fluorescentes utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 ((Carl Zeiss, Germany, México).

### **Análisis Estadístico**

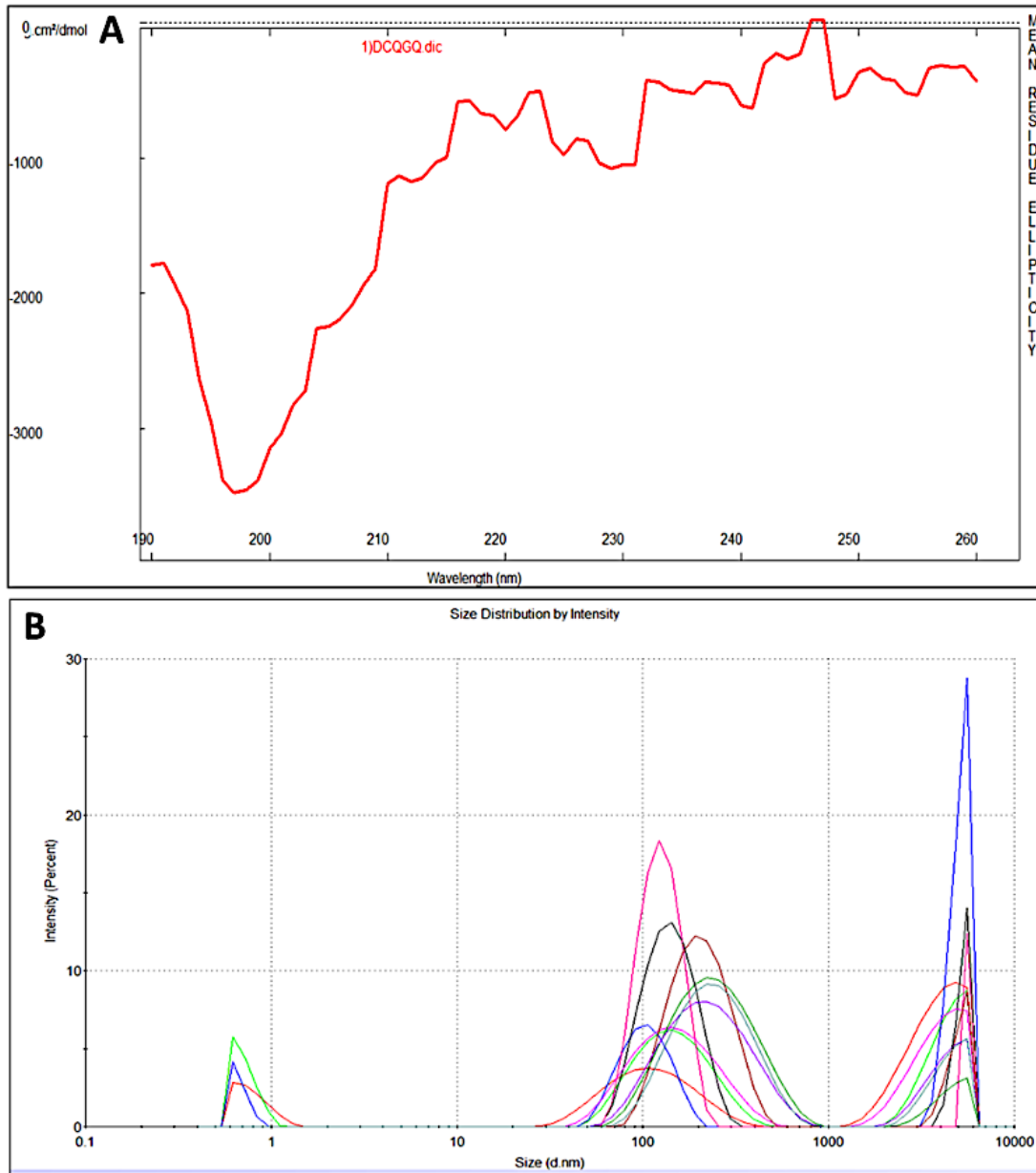
Los ensayos se realizaron por triplicado, se aplicó ANOVA a dos colas con corrección de Bonferroni, como prueba estadística para el análisis de determinación en el porcentaje y valor de significancia del ensayo de proliferación celular, para la expresión diferencial en los ensayos de RT-PCR, los Western Blot, la actividad enzimática de ALP y de la formación de nódulos mineralizados. Se estableció que el valor de  $p$  como significativo fuera  $<0.05$ . Los análisis se realizaron en el software GraphPad (GraphPad Software Inc., USA)



## RESULTADOS

### Características físico-químicas de CEMP1-p4

CEMP1-p4 tiene un peso molecular de 1595.72 Da con un punto isoeléctrico teórico de 4.03. La hidrofobicidad relativa teórica es de 20,15 y GRAVY es de -1,160. Estas características hacen de CEMP1-p4 una secuencia hidrofílica. El dicroísmo circular de CEMP1-p4 mostró un espectro con valores de una señal débil negativa cercanos a 197 nm. El espectro refleja una estructura aleatoria de CEMP1-p4 (Figura 10A). El análisis de dispersión de luz dinámica mostró que CEMP1-p4 forma especies monoméricas de ~10nm y agregados poliméricos de ~ 120 y ~ 5000 nm (Figura 10B).

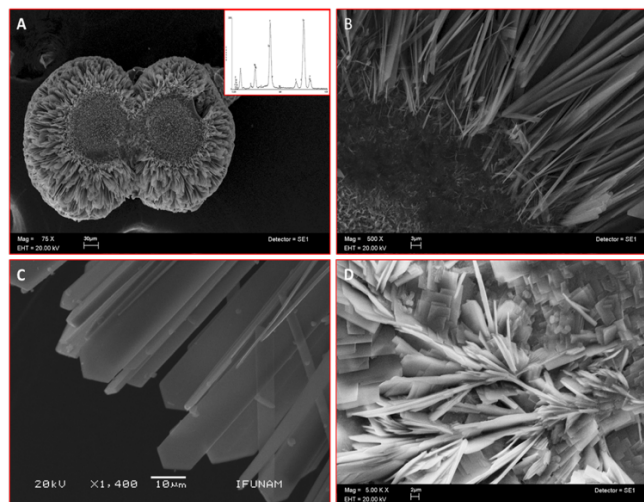


**Figura 10.** A) Espectro de diroísmo circular de CEMP-p4. La falta de señales en la región UV lejana indica que la estructura secundaria del péptido es principalmente aleatoria B) Las mediciones de dispersión de luz dinámica revelan que CEMP1-p4 adopta tres estados de oligomerización a 32 ° C



## CEMP1-p4 induce la mineralización en un sistema in vitro libre de células

Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) del mineral formado en un gel semisólido in vitro por CEMP1-p4, reveló la formación de estructuras en forma de esfera con un tamaño de  $\sim 225 \mu\text{m}$  (Figura 11A). Estas esferas contenían un núcleo de pequeños cristales desorganizados. Este núcleo parecía dar origen a cristales en forma de aguja, que mostraban una disposición radialmente espacial (Figura 11B) y se convertían en estructuras densamente empaquetadas y cambiando a una característica cuadrangular, terminando angularmente en el frente de crecimiento (Figura 11C). La relación Ca / P de los cristales analizados por espectroscopia de rayos X de dispersión de energía (EDS) fue de  $1,52 \pm 0,03$  (espectro insertado en 11A), como el valor de la relación Ca / P de la hidroxiapatita en hueso. La albúmina de suero bovino (BSA) se utilizó como proteína control (Figura 11D), lo que reveló que se formaron cristales planos y los cristales depositados se asemejaban a características de laminillas. Los cristales inducidos por BSA mostraron relación Ca / P de 1.



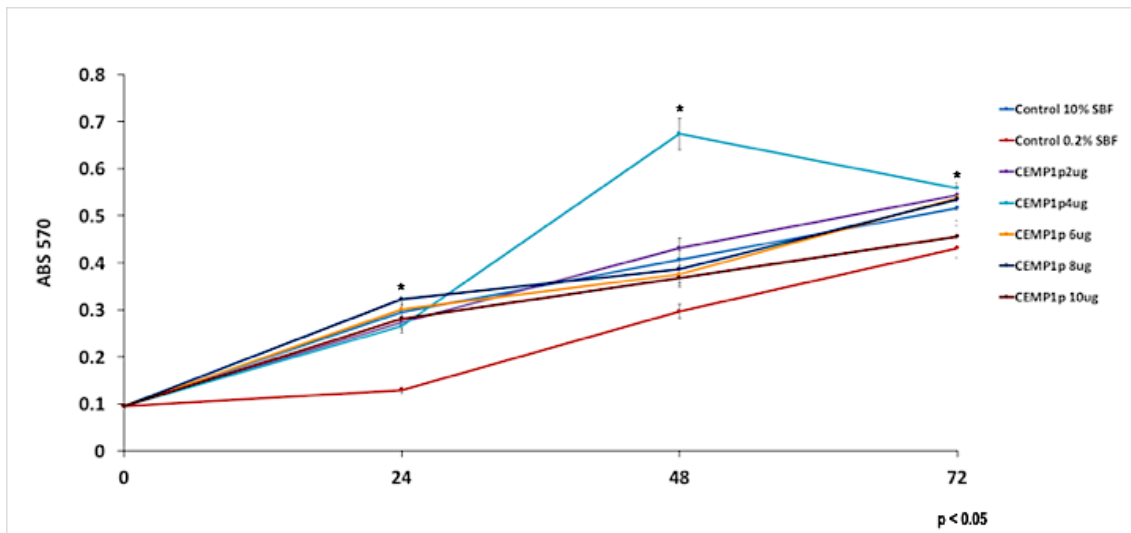
**Figura 11.** Imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) de estructuras esféricas formadas in vitro por CEMP1-p4 (el recuadro indica una relación Ca / P de 1,52) (A). (B) Un aumento mayor muestra un núcleo amorfo con cristales nacientes en forma de aguja. (C) Los cristales de hidroxiapatita muestran un frente de crecimiento de forma angular. (D) Control utilizando BSA muestra cristales en forma de placa, planos y depositados parecidos a laminillas



## Proliferación celular

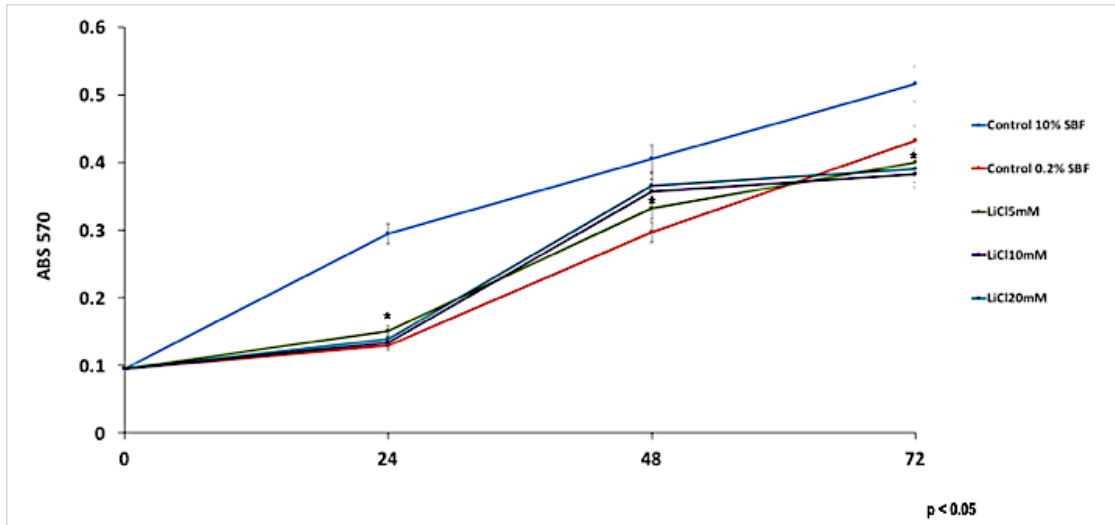
El ensayo de proliferación celular demostró, como se puede observar en la figura 12 y 14 que, CEMP1-p4 a 4 $\mu$ g/mL era la concentración óptimo ya que los HOMSC proliferaron en un 83%, 92% y 113% a las 24, 48 y 72 hrs respectivamente en comparación con los controles positivos. Asimismo la concentración no citotóxica del cloruro de litio para las HOMSCs fue de 5mM respecto a los controles negativos como se observa en la figura 13 y 14. El análisis para evaluar la diferencias entre los diferentes tiempos y condiciones del ensayo se determinó mediante la prueba estadística ANOVA.

Falta la descripción del análisis estadístico.

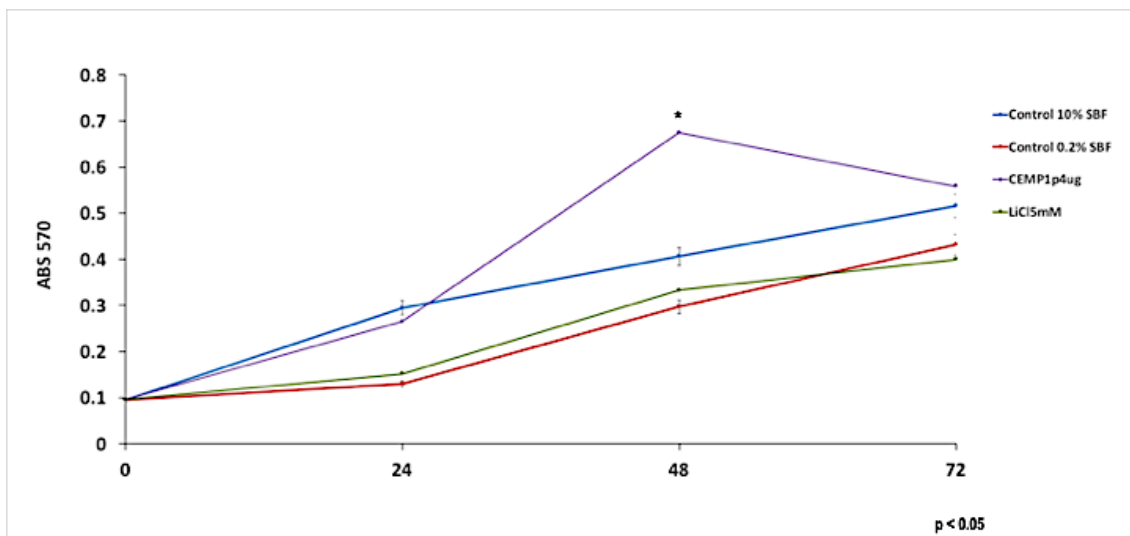


**Figura 12.** Diferentes concentraciones de CEMP1-p4 desde 2  $\mu$ g/ml; 4 $\mu$ g/ml; 6 $\mu$ g/ml, 8 $\mu$ g/ml y 10 $\mu$ g/ml fueron evaluadas en ensayos de proliferación en células HOMSCs desde las 24, 48 y 72 horas de tiempo, resultando la dosis de 4 $\mu$ g/ml ser inductora de proliferación de forma significativa respecto al control negativo (0.2% SBF). Por lo que fue la dosis empleada para los posteriores ensayos experimentales. Control positivo para este ensayo (10% SBF). ANOVA \*p<0-05





**Figura 13.** La dosis de cloruro de litio (LiCl) desde 5mM, 10mM y 20mM no es citotóxica para las células HOMSCs desde un periodo de tiempo de 24, 48 a 72 horas y es significativamente menos inductora de proliferación respecto al control positivo (10% SBF), por lo que la dosis utilizada para los posteriores ensayos experimentales fue 5mM. Control negativo para este ensayo (0.2% SBF). ANOVA \*p<0-05

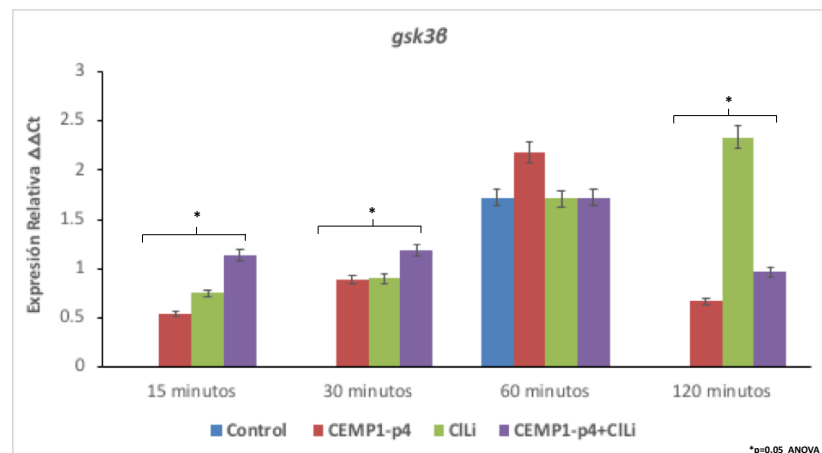
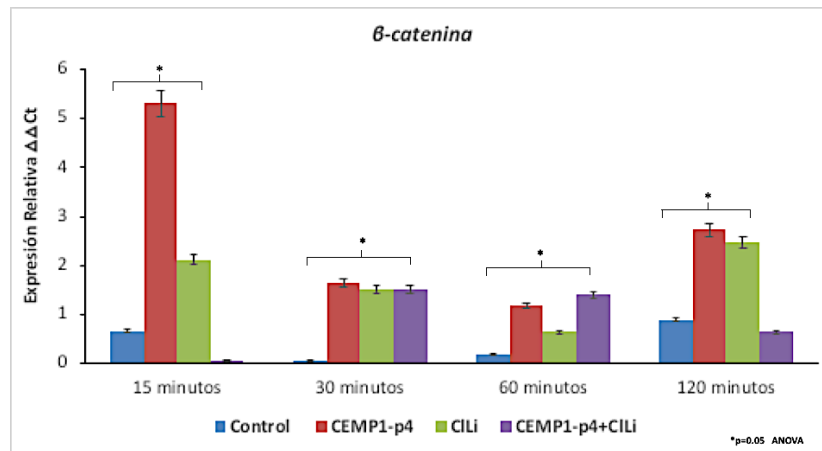


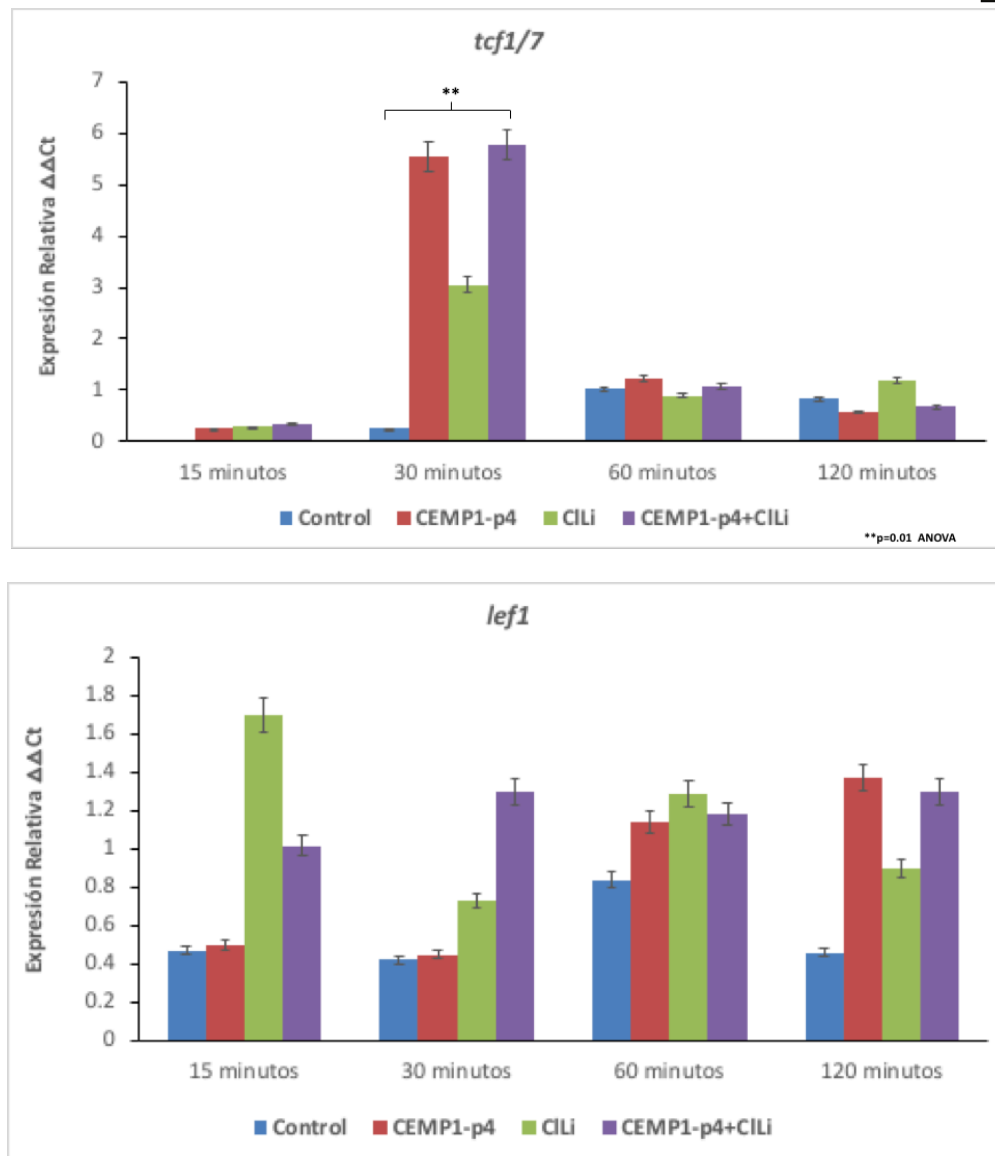
**Figura 14.** Representación gráfica de la dosis de CEMP1-p4 4µg/ml y de cloruro de litio (LiCl) 5mM en células HOMSCs; donde se observa la actividad como inductor de proliferación del péptido y la ausencia de citotoxicidad celular del LiCl. Control positivo para este ensayo (10% SBF) y control negativo (0.2% SBF) ANOVA \*p<0-05



## CEMP1-p4 induce la expresión transcripcional del RNAm de las proteínas de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina.

Se ha descrito la activación de la vía canónica Wnt como promotora para inducir proliferación y diferenciación celular. A nivel de RNAm, CEMP1-p4 induce la expresión relativa de  $\beta$ -catenina en las HOMSC de manera curso temporal desde los 15 minutos después de la adición de CEMP1-p4 en 6.6 veces, disminuye a los 30 y 60 minutos y aumenta en 2.1 veces a las 2 h en comparación con los controles. Lef1 aumenta su expresión 2 veces a los 30 min y Tcf1 aumenta 18 veces a los 30 min en comparación con los controles. GSK3  $\beta$  alcanza su máxima expresión a los 60 min en 1.2 veces en comparación con los controles (Figura 15) El análisis para evaluar la diferencias entre los diferentes tiempos y condiciones del ensayo se determinó mediante la prueba estadística ANOVA.



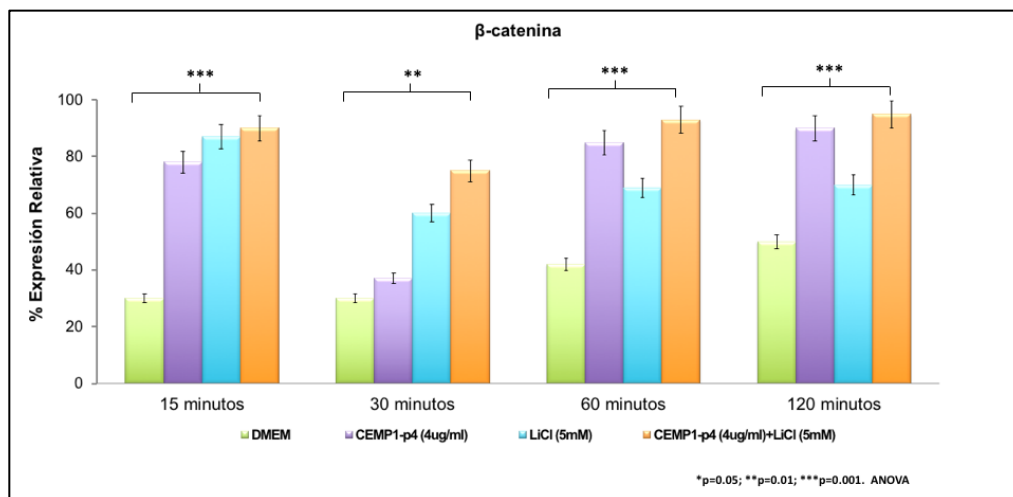
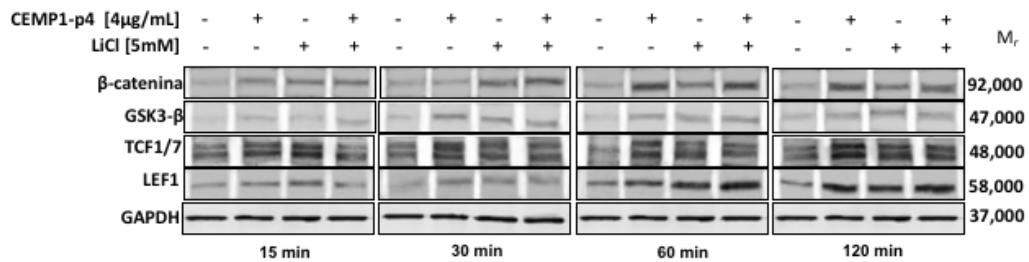


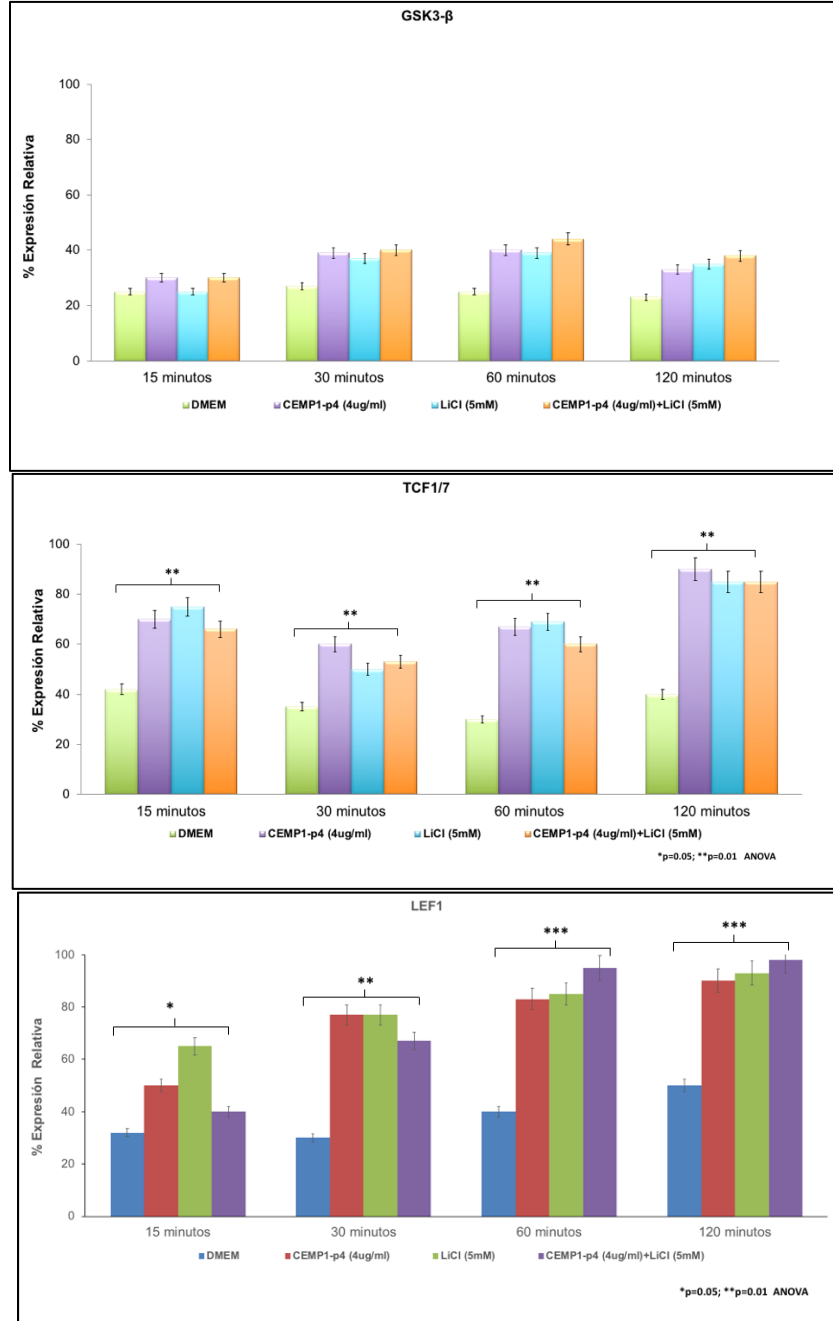
**Figura 15.** Análisis por RT-PCR de la expresión de  $\beta$ -catenina,  $gsk3\beta$ , *tcf1/7* y *lef1*. Resultado del tratamiento en células HOMSCs en presencia y ausencia de CEMP1p4 (4ug/ml) y de LiCl (5mM) a diferentes tiempos (15, 30, 60 y 120 minutos respectivamente) donde se puede observar la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina inducida por el péptido desde 15 minutos de tratamiento; a los 60 y 120 minutos donde la expresión génica aunque se ve reducida con respecto al tiempo inicial, se mantiene durante el tiempo de manera significativa. Para GSK3 $\beta$  la expresión es reducida desde tiempos iniciales (15 y 30 minutos) a los 120 minutos hay un incremento en la expresión con tratamiento de LiCl. CEMP1p4 induce la sobreexpresión de TCF a los 30 minutos de tratamiento, se reduce de forma significativa a los 60 y 120 minutos. Lef1 incrementa su expresión a través del tiempo a los 15 y 60 minutos de tratamiento por LiCl, así como la sinergia con el péptido a los 30 y 120 minutos. El péptido indujo la expresión de *lef1* a los 120 minutos. La determinación de la expresión en el análisis se realizó por el software Rotor Gene 6000 (Qiagen, USA) mediante  $\Delta\Delta Ct$  y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA. \*p<0-05



## CEMP1-p4 induce la expresión de proteínas de la vía de señalización celular Wnt/ $\beta$ -catenina en HOMSCs

A nivel de proteínas, la expresión de  $\beta$ -catenina aumentó en 2, 0,7 y 0,7 veces a los 15, 30 y 120 min respectivamente, después de la adición de CEMP1-p4. No hubo diferencias de expresión de GSK3 entre cultivos experimentales y de control. Tcf1 / 7 mostró su máxima expresión a los 15 y 120 min por 1- y 1,2 veces en comparación con los controles. Lef1 mantuvo una expresión constante en todo momento probado y aumentado en 1 vez en comparación con los controles (Figura 16). Estos datos tomados en conjunto indican que CEMP1-p4 induce la vía de señalización de Wnt /  $\beta$ -catenina. El análisis para evaluar la diferencias entre los diferentes tiempos y condiciones del ensayo se determinó mediante la prueba estadística ANOVA.



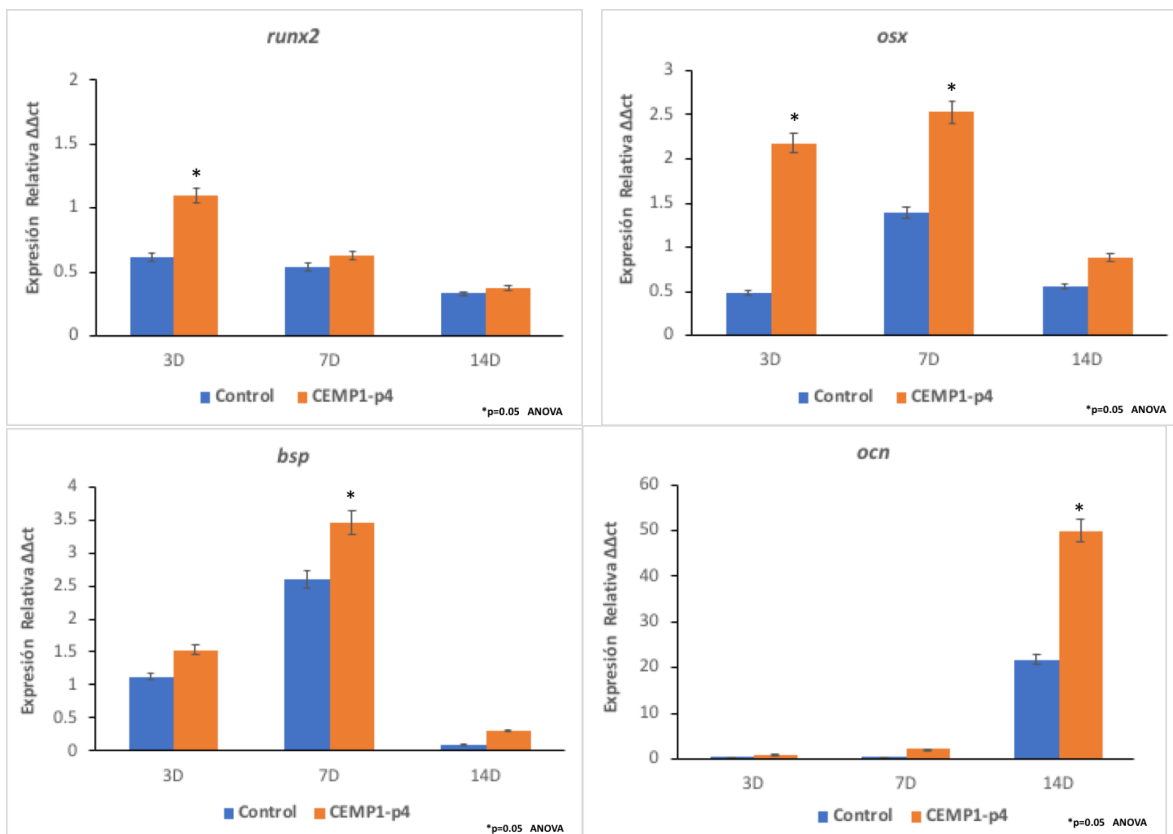


**Figura 16.** Western Blot del tratamiento en células HOMSCs en presencia y ausencia de CEMP1p4 (4ug/ml) y de LiCl (5mM), donde se puede observar la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina inducida por el péptido desde tiempos cortos de tratamiento manteniéndose hasta las 120 minutos del mismo. Para GSK3 $\beta$  la expresión se ve reducida en 15, 60 y 120 minutos de tratamiento y se sobreexpresa a los 30 minutos. CEMP1p4 induce la sobreexpresión de TCF desde los 15 minutos de tratamiento y se mantiene durante el tiempo hasta los 120 minutos. La expresión de Lef1, se incrementa y se mantiene desde los 15 minutos inducido por el péptido y de forma sinérgica con el LiCl. La determinación de la expresión en el análisis de proteínas se realizó por la medición de la densidad de la banda de proteínas utilizando el software ImageJ y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA. \*p<0-05



## CEMP1-p4 induce la expresión del RNAm de marcadores relacionados con biomineralización en HOMSCs

Las expresión de marcadores relacionados con la mineralización a nivel de RNAm por HOMSC a los 3, 7 y 14 días reveló que en las etapas iniciales de mineralización, RUNX2 y OSX aumentaron en 2.1 y 3.7 veces y que IBSP se expresó apenas 0.2 veces en comparación con los controles. En las etapas intermedias de la mineralización, OSX y IBSP aumentaron su expresión en 3.7 y 4.2 veces, respectivamente, en comparación con los controles. OCN alcanzó su máxima expresión en las últimas etapas de mineralización en 1.7 veces en comparación con el control. Los resultados muestran que CEMP1-p4 promueve la diferenciación de HOMSC a un fenotipo celular parecido al "tipo mineralizante". El análisis para evaluar la diferencias entre los diferentes tiempos y condiciones del ensayo se determinó mediante la prueba estadística ANOVA. Figura 17.

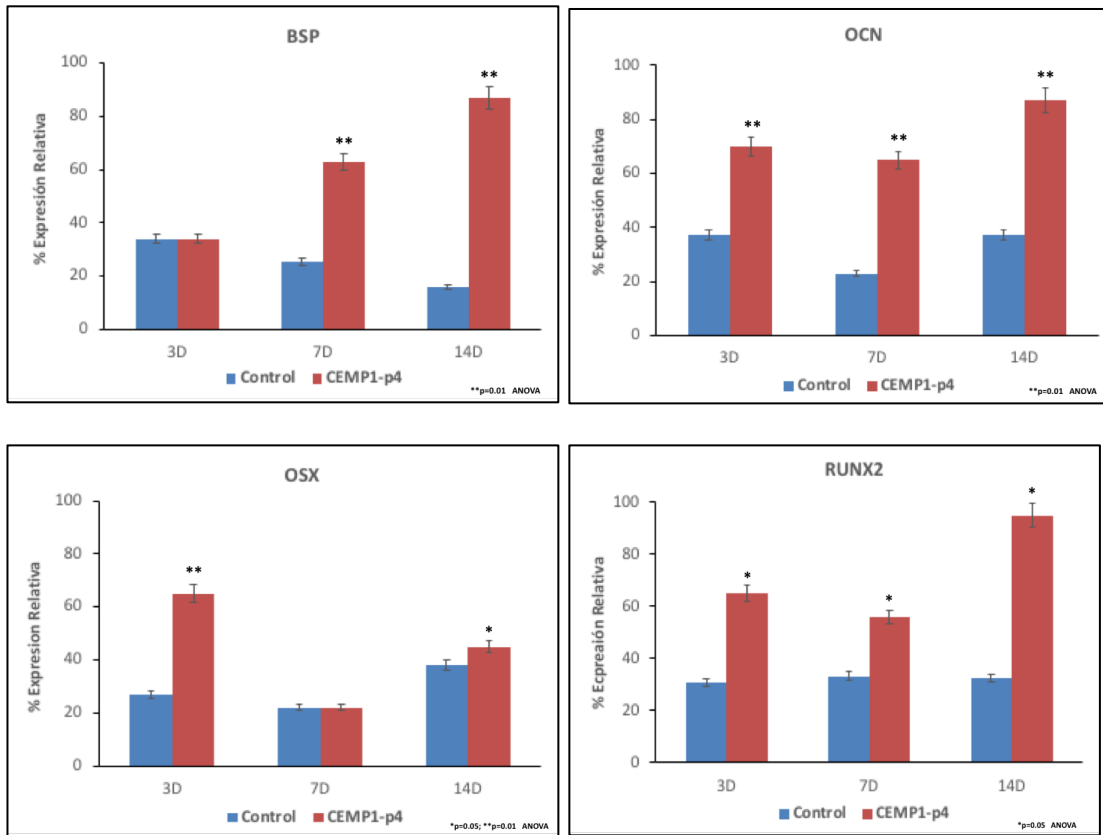
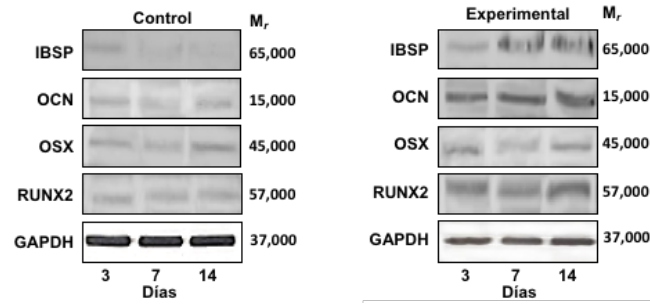


**Figura 17.** Análisis por RT-PCR de la expresión de *runx2*, *osx*, *bsp* y *ocn*. Resultado del tratamiento de las células HOMSCs en presencia y ausencia de CEMP1-p4 (4ug/ml) con medio osteoinductor o mineralizante (MM) a diferentes tiempos (3, 7 y 14 días respectivamente), donde se puede observar la sobreexpresión de *osx*, *runx2* y *bsp*, inducida por el péptido desde los 3 días de tratamiento manteniéndose hasta los 7 días y disminuyendo a los 14 días. Para OCN la expresión se ve inducida a los 14 días. La determinación de la expresión en el análisis se realizó por el software Rotor Gene 6000 (Qiagen, USA) mediante  $\Delta\Delta Ct$  y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA. \* $p < 0.05$



## **CEMP1-p4 induce la expresión proteica de marcadores relacionados con biomineralización en HOMSCs**

El proceso de diferenciación de HOMSC tratados con CEMP1-p4 a un fenotipo mineralizante fue evaluado por Western blot. La expresión de IBSP aumentó en 0.4, 1.6 y 5.0 veces a los 3, 7 y 14 días, respectivamente, en comparación con los controles. Los cultivos experimentales mostraron el aumento de OCN en 2.4, 2.2 y 3.3 veces, en comparación con los controles en todos los cursos temporales probados. RUNX2 fue expresado por 2.2, 1.9 y 3.2 veces a los 3, 7 y 14 días, respectivamente, en comparación con los controles. La expresión de OSX revelada un efecto positivo de CEMP1-p4 en HOMSC, ya que los valores de expresión a los 3, 7 y 14 días de cultivo fueron 2.2, 0.7 y 1.6, respectivamente, en comparación con los controles (Figura 18) .En conjunto, estos datos muestran que los HOMSC tratados con CEMP1-p4 expresan marcadores osteoprogenitores y se diferencian hacia un fenotipo celular similar al mineralizante. El análisis para evaluar la diferencias entre los diferentes tiempos y condiciones del ensayo se determinó mediante la prueba estadística ANOVA.



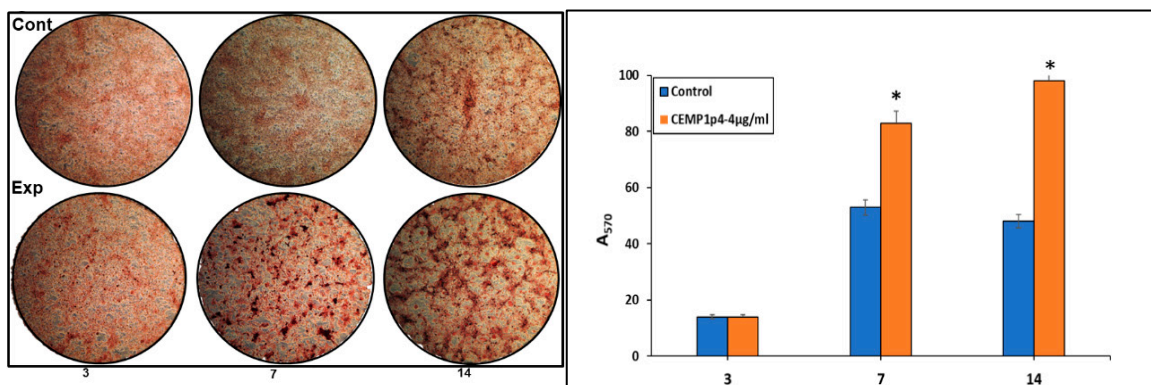
**Figura 18** Western Blot del tratamiento en células HOMSCs en presencia y ausencia de CEMP1p4 (4ug/ml) con medio osteoinductor o mineralizante (MM) a diferentes tiempos (3, 7 y 14 días respectivamente) donde se puede observar una mayor expresión desde 3 días de tratamiento y manteniéndose hasta el final del tiempo (14 días) para el caso de OCN y RUNX2; OSX tiene un incremento desde día 3 después descendiendo y nuevamente incrementa a los 14 días de tratamiento. La determinación de la expresión en el análisis de proteínas se realizó por la medición de la densidad de la banda de proteínas utilizando el software ImageJ y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA. \* $p < 0.05$





### CEMP1-p4 induce mineralización en HOMSCs

Las HOMSC tratados durante 3, 7 y 14 días con CEMP1-p4 (4ug/mL) mostraron que CEMP1-p4 indujo que HOMSC formaran nódulos de calcio mineralizado. Las células control tratadas con SBF al 10% suplementado con 5 mM de B-glicerofosfato y 50 g/mL de ácido ascórbico también formaron nódulos de calcio. La cuantificación de minerales demostró diferencias significativas, ya que los cultivos experimentales mostraron 58% e incrementaron 107% en los depósitos minerales a los 7 y 14 días de cultivo en comparación con los controles. (Figura 19). El análisis para evaluar la diferencias entre los diferentes tiempos y condiciones del ensayo se determinó mediante la prueba estadística ANOVA.

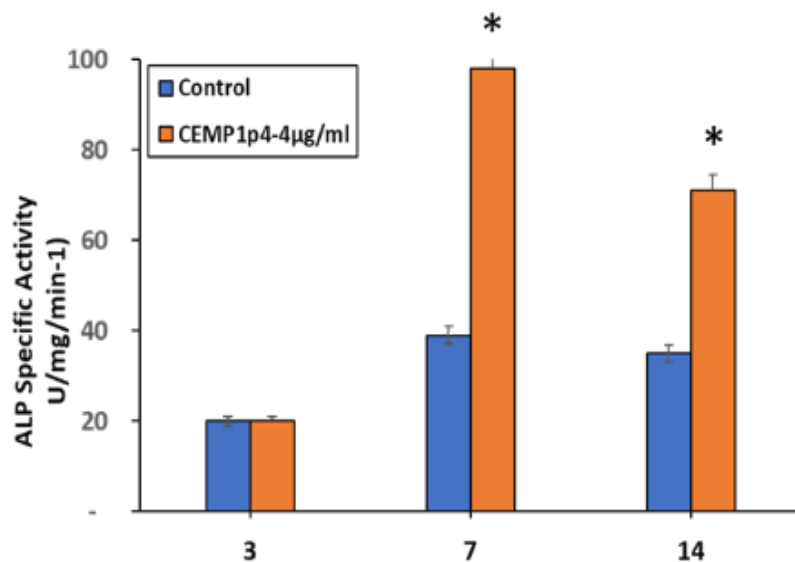


**Figura 19.** Tinción de nódulos de calcio con Alizarina Roja S después del tratamiento en células HOMSCs en presencia y ausencia de CEMP1p4 (4ug/ml) y de medio osteoinductor o mineralizante (MM) a diferentes tiempos (3, 7 y 14 días respectivamente) donde se puede observar una mayor tinción de precipitados de calcio o nódulos en presencia del péptido con respecto al tratamiento con medio mineralizante (MM). La formación de minerales se cuantificó mediante cetilpiridinio cloruro (CPC), lo que demuestra que CEMP1-p4 es un potente inductor de sales de calcio. La determinación de la expresión diferencial se determinó mediante la prueba estadística ANOVA. \* p <0.05.



### CEMP1-p4 induce la actividad específica de Fosfatasa Alcalina (ALP) en HOMSCs

Las HOMSC tratados con CEMP1-p4 a 4ug/ml aumentaron la actividad específica de la enzima fosfatasa alcalina a 7 y 14 días en 1.5 y 1.1 veces mayor respectivamente, en comparación con los controles. Figura 20. El análisis para evaluar la diferencias entre los diferentes tiempos y condiciones del ensayo se determinó mediante la prueba estadística ANOVA.



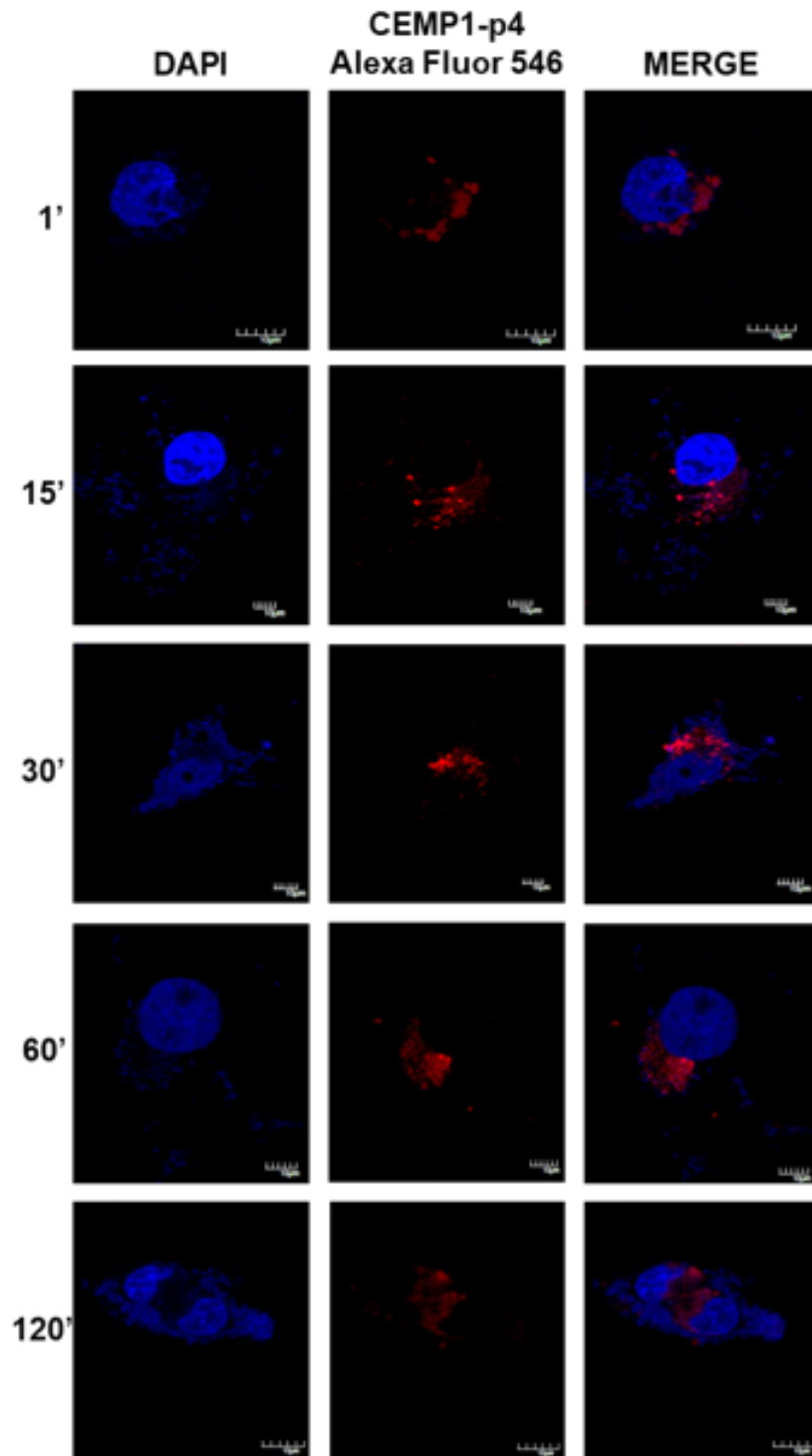
**Figura 20.** Efecto sobre la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) después del tratamiento en células HOMSCs en presencia y ausencia de CEMP1p4 (4ug/ml) y de medio osteoinductor o mineralizante (MM) con dexametasona y sin dexametasona a diferentes tiempos (3, 7 y 14 días respectivamente), donde se puede observar que a los 7 y 14 días de forma significativo existe una mayor actividad de ALP inducida por el péptido. La determinación de la expresión diferencial se determinó mediante la prueba estadística ANOVA. \*p < 0.05.



### **Internalización de CEMP1-p4 en HOMSCs**

Las HOMSC tratadas con CEMP1-p4 marcado con Alexa Fluor 546 mostraron después de 1 minuto la internalización del péptido con una localización nuclear y mayoritariamente perinuclear, con una distribución compacta y homogénea.

Después de 1 y 15 minutos de incubación, CEMP1-p4 se agrega en el citoplasma y se mantiene en ubicación nuclear y rodeando la membrana nuclear. A los 30 min, la mayor parte del péptido se aglomera de forma paranuclear, con algunos agregados aislados en el núcleo. A los 60 y 120 min, el péptido pareció dispersarse y la mayor parte del material fluorescente tenía una localización difusa alrededor del área nuclear. Estos resultados revelaron que CEMP1-p4 posee varias de las propiedades deseadas, como solubilidad, rápida penetración celular y retención intracelular además de mostrar una localización perinuclear y nuclear específica. (Figura 21)



**Figura 21.** Ubicación por microscopía confocal de CEMP1-p4. CEMP1-p4 marcado con Alexa Fluor 546 se localizó principalmente alrededor del núcleo desde el primer minuto y el patrón se mantuvo a través del tiempo, siendo éste difuso y organizado en gránulos y dispersado a los 120 minutos. Aumento original, 3400. Barra de escala = 10  $\mu$ m.

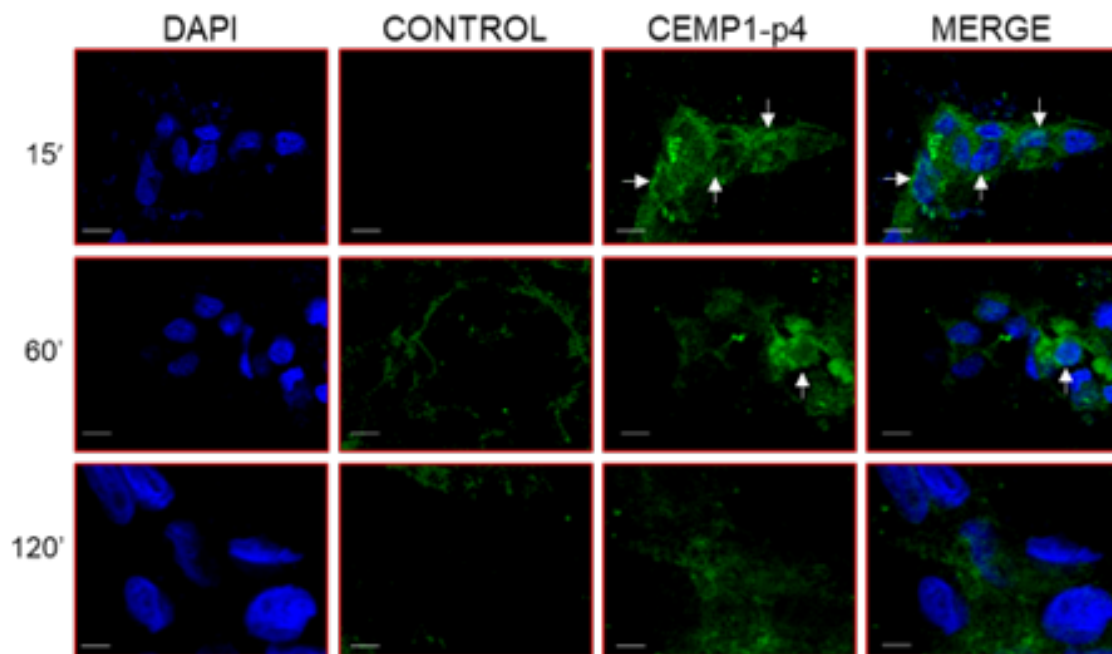


### Traslación nuclear de $\beta$ -catenina inducida por CEMP1-p4 en HOMSCs

Nuestros resultados mostraron que después de 15 minutos de tratamiento con CEMP1-p4 en las HOMSC, la expresión de  $\beta$ -catenina estaba ubicada alrededor de la membrana nuclear, en el núcleo y en la membrana celular de forma punteante.

Transcurrido 1 hora de tratamiento, la expresión puntuada de  $\beta$ -catenina fue más intensa en el núcleo. Sin embargo, 2 horas después del tratamiento, la  $\beta$ -catenina casi desapareció del núcleo y se visualiza débilmente ubicada a nivel del citoplasma celular.

(Figura 22)



**Figura 22.** La translocación de  $\beta$ -catenina después de la estimulación de las HOMSC con CEMP1-p4 (4 $\mu$ g/ml) fue determinado usando anticuerpo policlonal de conejo anti- $\beta$ -catenina humana. La  $\beta$ -catenina se localizó durante 15 a 60 minutos alrededor de la membrana nuclear y en el núcleo así como de a nivel de membrana celular. A los 120 min del tratamiento con CEMP1-p4,  $\beta$ -catenina se visualiza débilmente a nivel citoplasmático. La imagen es representativa de datos de tres experimentos. Las flechas indican la expresión puntuada de  $\beta$ -catenina en el núcleo celular. Aumento original, 3400. Barra de escala = 10  $\mu$ m.



## DISCUSIÓN

Los hallazgos de este estudio muestran que un péptido sintético de 15 aminoácidos de longitud (CEMP1-p4), correspondiente a la región C-terminal de CEMP1, activa la señalización de  $\beta$ -catenina en las HOMSC, induciendo su diferenciación a un fenotipo parecido al mineralizante. La secuencia de CEMP1-p4 muestra el 80% de los aminoácidos promotores del desorden intrínseco en su composición, por tanto, pertenece a la región más desordenada de CEMP1. La plasticidad de las regiones N y C terminales de la proteína muestran propiedades asociadas con la nucleación, crecimiento y unión de cristales de hidroxiapatita durante el proceso de biomineralización [66, 67]. Nuestros datos experimentales soportan esta afirmación, ya que las características fisicoquímicas de CEMP1-p4 reveladas por dicroísmo circular mostraron que CEMP1-p4 tiene una estructura enrollada al azar. Los datos experimentales de DLS mostraron que CEMP1-p4 forma tres estados diferentes de oligomerización, el estado de monómero con una relación hidrodinámica de 0,5 nm, y dos oligómeros de 125 nm y 5.0  $\mu$ m. El análisis por DLS detectó la formación del complejo péptido-péptido en solución amortiguadora, demostrando por primera vez una posible capacidad de autoensamblaje.

CEMP1-p4 induce la formación de esferas con un centro de fosfato cálcico amorfo (ACP) y tiene un efecto significativo sobre el modo de formación de hidroxiapatita. Las partículas presentes en el centro de las esferas eventualmente se transformaron en cristales en forma de placa, y debido a sus propiedades fisicoquímicas, CEMP1-p4 induce la nucleación de cristales de hidroxiapatita confirmada por análisis de EDS que revelaron una relación Ca/P de 1,52. Las secuencias ácidas y desordenadas cumplen varios roles en la formación de cristales y controlar el crecimiento de cristales de hidroxiapatita. Los péptidos involucrados en la biomineralización, como CEMP1-p4, tienen una estructura



secundaria de espiral aleatoria que permite interacciones intermoleculares en la interfaz péptido-mineral [68, 69], probablemente por la interacción de CEMP1-p4 con iones fosfato causada por cambios conformacionales en CEMP1-p4 que promueven la transformación de la fase amorfa a la fase cristalina [19].

Recientemente, células madre mesenquimales aisladas de la lámina propia de la mucosa oral humana (HOMSCs) [70, 71], han demostrado ser multipotentes y pueden diferenciarse en tejidos multilinaje, incluyendo hueso, cartílago, tejido adiposo, células y neuronas similares a células de Schwann *in vitro* e *in vivo* [70, 72-74].

Este estudio mostró que las HOMSC tratadas con CEMP1-p4 aumentaron su proliferación en mayor medida en comparación con la condicionante experimental del 10% de SBF. Encontramos que CEMP1-p4 desencadena la expresión de  $\beta$ -catenina de forma inmediata, desde los 15 minutos a nivel de RNAm y proteína en 6.6 y 2.0 veces en comparación con los controles, respectivamente. También se muestra que CEMP1-p4 inactiva GSK-3 $\beta$ , lo que aumentó la proliferación de las HOMSC, indicando que CEMP1-p4 posee una actividad similar a un factor de crecimiento, o mimetizando el rol del cloruro de litio (LiCl), habitualmente utilizado como estimulador o inductor positivo de la vía Wnt.

Se ha descrito en la literatura que la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina juega un papel importante durante el proceso de mineralización, por lo anterior, determinamos la expresión de GSK3 $\beta$ , Tcf1 y Lef1, que son fundamentales para dicha vía de transducción.

Algunos autores han sugerido que los osteoblastos son dianas celulares importantes de la vía Wnt: primeramente porque la  $\beta$ -catenina es esencial para determinar si los progenitores mesenquimales se convierten en osteoblastos o condrocitos, indicando que la vía de señalización Wnt puede afectar al papel final ejercido por el osteoblasto. Un mecanismo adicional por el cual Wnt puede controlar la función del osteoblasto es



mediante el bloqueo de la adipogénesis, ya que puede inhibir factores de transcripción adipogénica como C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$ . Asimismo se ha sugerido que la vía de señalización Wnt puede determinar el destino celular de los precursores mesenquimales, a la vez que la actividad formadora de hueso del osteoblasto. Por tanto, la vía canónica Wnt controla los osteoblastos a diferentes niveles: diferenciación, proliferación o apoptosis, y función final. [118]

Estudios recientes sugieren incluso el control genético sobre aspectos cualitativos óseos, estableciendo una firme conexión entre masa ósea y mutaciones del co-receptor de la vía de señalización Wnt (proteína relacionada con LDL, LRP5) o mutaciones del antagonista de Wnt (SOST o esclerostina); a su vez, los avances en genética molecular en ratones han permitido confirmar la importancia crítica de la vía de señalización Wnt en el metabolismo óseo y en la enfermedad ósea. [119]

Por otro lado se ha documentado que el cloruro de litio (LiCl) es un activador conocido de la vía canónica Wnt y es empleado frecuentemente como promotor para activar la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina. [120] El LiCl es frecuentemente utilizado como promotor de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina por inhibición de GSK3 $\beta$ , el cual impide la fosforilación de  $\beta$ -catenina en la serina 33, 37 o treonina 41 y su degradación. [121]

Se ha reportado que el LiCl reduce los niveles de p- $\beta$ -catenina, incrementa la actividad de  $\beta$ -catenina total, de  $\beta$ -catenina nuclear y de  $\beta$ -catenina/TCF demostrando de esta manera que la vía de señalización Wnt- $\beta$ catenina está activa. [122]

El rol del LiCl en proliferación celular es controversial. Se ha demostrado que es promotor e inhibidor de la misma en varios tipos celulares. Estudios sugiere que el LiCl inhibe la formación de colonias de células troncales derivadas de la pulpa dental de dientes deciduos exfoliados. Se ha encontrado que LiCl es promotor de la proliferación de células





troncales de papila apical y mesenquimales humanas. La inhibición es resultado de la reducción de la expresión del proto-oncogene c-fos. Los tipos celulares estudiados donde LiCl inhibe la proliferación incluyen: células derivadas del folículo dental, células de glioma, células troncales adiposas, células troncales derivadas de sangre menstrual, células musculares lisas vasculares- [123]. Algunos estudios han reportado que el LiCl induce la detención -el arresto- del crecimiento celular, apoptosis y la diferenciación terminal de varios tumores malignos humanos a través de GSK3 $\beta$  [124].

GSK3 $\beta$  es un regulador negativo de la vía de señalización de Wnt el cual juega un papel central en el desarrollo de los invertebrados y vertebrados. Es una serina-treonina cinasa que modula muchas vías de señalización y es una llave enzimática clave en la regulación de diversos eventos biológicos incluyendo la respuesta celular a los ligandos Wnt. GSK3 $\beta$  además está involucrada en varios procesos celulares que van desde el metabolismo del glucógeno hasta la regulación del ciclo celular y proliferación. El LiCl activa componentes río debajo de la vía de señalización de Wnt, dirigiendo la acumulación de  $\beta$ -catenina. La activación es consecuencia de la inhibición de un dominio negativo de GSK3 $\beta$  por litio [125].

Nuestros resultados mostraron que CEMP1-p4 mejoró la expresión de  $\beta$ -catenina, mientras que la expresión de GSK3 $\beta$  disminuyó y los factores de transcripción río abajo de la vía, como Tcf1 y Lef1 que fueron activados posterior al tratamiento con CEMP1-p4 [75], revelando que CEMP1-p4 participa en la vía de señalización Wnt /  $\beta$ -catenina, induciendo diferenciación de las HOMSC a un fenotipo "parecido al mineralizante".

Más importante aún, CEMP1-p4 parece inducir la proliferación y diferenciación de osteoprogenitores en las HOMSCs. La expresión a nivel de ARNm y proteínas de moléculas relacionadas con la mineralización respalda aún más esta premisa [76]. A nivel



de ARNm, RUNX2 se expresó en las etapas iniciales de mineralización. Este factor de transcripción es de singular importancia ya que promueve la diferenciación de osteoprogenitores para adoptar un fenotipo osteoblástico maduro [77], mientras que OSX se expresó en las etapas medias de mineralización. Este factor de transcripción está asociado con la regulación de la formación de hueso [78]. La sialoproteína de unión a integrina (IBSP) es una glicoproteína que desempeña un papel importante como nucleador de los cristales de hidroxiapatita, la unión celular y la diferenciación celular [79-81]. CEMP1-p4 indujo la expresión de IBSP en las HOMSC durante las etapas medias de mineralización. OCN muestra afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  y regula la hidroxiapatita y participa en las últimas etapas de mineralización [68, 82, 83]. Su expresión implica el inicio de la deposición de matriz mineralizada. Significativamente, a nivel de proteína, CEMP1-p4 induce la fuerte expresión de RUNX2 y OCN de 3 a 14 días en comparación con los controles. OSX fue altamente expresada en las etapas inicial y tardía de la mineralización, y IBSP mostró una fuerte expresión en las etapas media y tardía de la mineralización. Incrementos en la actividad de ALP por CEMP1-p4 y la formación de nódulos de calcio denota que las HOMSC adquirieron un fenotipo "parecido al mineralizante" [68, 82, 83]. Estos datos en conjunto indican que CEMP1-p4 conduce a las HOMSC a un fenotipo de células osteoprogenitoras a través de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.

La diferenciación de osteoprogenitores está regulada por varias vías de señalización, así como por una serie de factores transcripcionales que determinan fundamentalmente el destino de las células madre hacia un fenotipo "similar al mineralizante" [84 - 91]. Se ha demostrado que la vía de señalización canónica de Wnt es necesaria para conservar la pluripotencia y la proliferación de las células madre embrionarias [16, 17], así como para la determinación del destino de las células madre [92, 93]. Wnt/ $\beta$ -catenina es una vía



principal relacionada con la diferenciación de osteoblastos [85, 86, 88, 94-98], y se ha demostrado que en presencia de la actividad de la vía de transducción Wnt, la  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo, donde se asocia con factores de transcripción Tcf / Lef para regular la expresión de genes diana [91, 99-102]. La  $\beta$ -catenina juega un papel directo en la diferenciación de los osteoblastos y algunos aspectos de CEMP1-p4 pueden estar mediados por la señalización de  $\beta$ -catenina [103-105]. Sin embargo, la  $\beta$ -catenina sola no es suficiente para inducir la diferenciación hacia células de tipo osteogénico, a menos que estén presentes otras señales estimulantes [106]. Creemos que un factor estimulante es CEMP1-p4, ya que promueve la regulación positiva de la expresión de RUNX2 [107]. Esto es apoyado por nuestro hallazgos, ya que la expresión de  $\beta$ -catenina se localizó alrededor de la membrana nuclear, en el núcleo y la membrana celular desde tiempos cortos como a los 15 minutos; y después de 1 hora, la expresión de  $\beta$ -catenina fue más intensa en el núcleo. Nuestros resultados indican que CEMP1-p4 aumenta la expresión de  $\beta$ -catenina, que induce que las células osteoprogenitoras y que sean capaces de diferenciarse en osteoblastos [84, 108]

Se ha descrito que el LiCl estimula indirectamente la osteogénesis al activar la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y promover un incremento significativo en la formación de nódulos mineralizados, así como un incremento en la actividad de ALP y la expresión de proteínas y factores de transcripción incluidas: Runx2, Msx2, Osx, estos hallazgos permiten inferir que es ésta, una de las vías de transducción asociada a la diferenciación celular y homeostasis en tejidos mineralizados [126]

Diversos estudios han utilizado el cloruro de litio para examinar el posible involucramiento de la vía de señalización canónica de Wnt en la regulación del comportamiento del proceso de diferenciación de células troncales de origen dental hacia un fenotipo



mineralizante. De forma indirecta se ha reconocido el rol de la vía Wnt en procesos de mineralización, se ha estudiado el incremento en la expresión de OCN, Runx2, y Colágena I así con un aumento en la actividad de ALP que sugieren que el LiCl estimula indirectamente la diferenciación hacia cementoblastos/osteoblastos de células troncales mesenquimales de origen dental. Concluyendo que la vía canónica Wnt está involucrada. [127]

La unión Tcf/Lef es el blanco final en la vía de transducción Wnt/ $\beta$ catenina y algunos estudios reportan la implicación funcional de esta regulación en la formación de tejidos mineralizados es mediada a través de Osx, sin embargo el mecanismo aún es desconocido. Estudios *in vitro* e *in vivo* con el uso de ratones transgenicos han demostrado que hay una interacción recíproca entre  $\beta$ -catenina y Osx durante la cementogenesis,  $\beta$ -catenina regula la expresión de Osx en la diferenciación de cementoblastos y en consecuencia en la formación de la matriz del cemento.  $\nexists$  Osx adicionalmente controla la actividad de  $\beta$ -catenina, mediante el control de la expresión de Tcf/Lef1. La importancia de esta interacción radica en que el entendimiento de este evento, como parte de los mecanismos moleculares que suceden en la formación del cemento durante el desarrollo radicular. Además podría permitir el diseño en un futuro de posibles estrategias para promover la regeneración de cemento o hueso, en la enfermedad periodontal. [128]

Los péptidos muestran una propensión a unirse a superficies proteicas planas, sin embargo, la mayoría de los péptidos son incapaces de pasar a través de la membrana celular y, por tanto, su utilidad es limitada. Los Péptidos que Penetran en las Células (CPP), contienen principalmente aminoácidos cargados positivamente o un patrón alterno de cadenas laterales con carga e hidrófobas.[109, 110]. La hidrofobicidad es crucial para

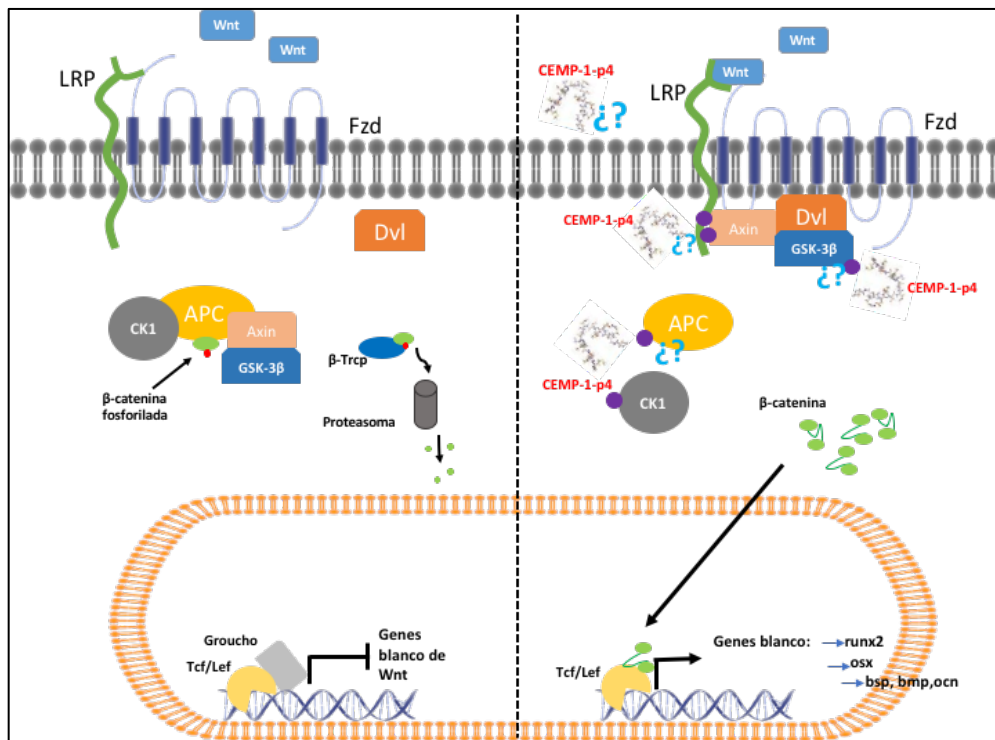


la inserción y penetración de la bicapa lipídica, y es así como los aminoácidos hidrofóbicos interactúan con el núcleo de las membranas [111-113]. Usando microscopía confocal, nosotros examinamos la ubicación subcelular de CEMP1-p4 marcado con fluorescencia. El péptido mostró una localización perinuclear inmediata, es decir al minuto 1 después de su adición al medio. El péptido CEMP1-p4 se visualizó organizado en agregados homogéneos, adoptando una localización paranuclear y algunos agregados en el núcleo. A medida que avanzaba el tiempo, CEMP1-p4 se acumulaba en estructuras vesiculares, posiblemente endosomas [114]. Algunas de las características necesarias para una absorción celular eficaz de los CPP son : a) hidrofobicidad hasta cierto punto y b) tramos de aminoácidos hidrófobos y catiónicos. CEMP1-p4 posee estas características y podría ser la razón por la que el péptido penetró en la membrana celular y adoptó una ubicación paranuclear en solo un minuto después de su adición. Esto es crucial para la activación de la vía Wnt [115-118] y de relevancia clínica, ya que los péptidos bioactivos y permeables a las células representan una estrategia prometedora para la aplicación de fármacos derivados de péptidos. Nuestros hallazgos de la señalización de  $\beta$ -catenina en HOMSC y su estimulación por CEMP1-p4 podrían tener implicaciones terapéuticas potenciales para la reparación y regeneración de tejidos mineralizados, incluido el hueso, cemento y dentina.



## CONCLUSIÓN

Este estudio muestra por primera vez la participación de la vía de señalización Wnt /  $\beta$ -catenina en la diferenciación mediada por CEMP1-p4 en HOMSCS. El papel del CEMP1-p4 sugiere que el mecanismo intracelular asociado con la activación de genes desencadenantes para inducir la diferenciación de células madre hacia un fenotipo osteoblástico es a través de la actividad de las moléculas de la vía de señalización canónica Wnt /  $\beta$ -catenina inducida por CEMP1-p4. Sin embargo, aún es necesario conocer el mecanismo de interacción de este péptido con estas moléculas, para determinar si es a través de interacciones por fosforilación que se activan o inactivan los complejos moleculares asociados a esta vía.



**Figura 23. Modelo hipotético de interacción de CEMP1-p4 en la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina.** CEMP1-p4 podría internalizarse a través de la bicapa lipídica celular; asimismo por las características de las propiedades físico-químicas del péptido podría asociarse por fosforilación al receptor o correceptor de la vía así como al complejo citoplasmático APC y de esa manera promover la acumulación citoplasmática de  $\beta$ -catenina y eventualmente promover la traslocación nuclear de la misma para la activación génica de moléculas asociadas al proceso de diferenciación hacia un fenotipo mineralizante en las HOMSCS



## REFERENCIAS

1. Koki-Ikeda, Shota-Suzuki, Yoshiki-Shigemitsu, Takeshi-Tenno, Natsuko-Goda, Atsunori-Oshima, Hidekazu Hiroaki, AK-Dunker. Presence of intrinsically disordered proteins can inhibit the nucleation phase of amyloid fibril formation of A $\beta$ (1–42) in amino acid sequence independent manner. (Intrinsically Disordered Proteins). *Journal of Molecular and Graphical Modeling* (2001) 19:1, 26-59.
2. P. E. Wright, H J Dyson. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of molecular biology*. (1999) 293:2, 321-331.
3. H.Jane Dyson, Peter E Wright. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* (2005) 6:3, 197-208.
4. Joanne N. Bright, Thomas B. Woolf y Jan H. Hoh. Predicting properties of intrinsically unstructured proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (2001) 76:3, 131-173.
5. Charles Galea y col. Proteomic studies of the intrinsically unstructured mammalian proteome. *Journal of Proteome Research* (2006) 5:10, 2839-2848.
6. Peter Tompa, Zsuzsanna Dosztanyi e Istvan Simon. Prevalent Structural Disorder in *E. coli* and *S. cerevisiae* Proteomes. *Journal of Proteome Research* (2006) 5, 1996-2000.
7. P. Tompa. The functional benefits of protein disorder. *Journal of Molecular Structure-Theochem* (2003) 6, 361-371.
8. Uversky VN. Intrinsically Disordered Proteins and Their “Mysterious (Meta)Physics. *Front. Phys.* (2019) 7:10. doi: 10.3389/fphy.2019.00010
9. Tonetti, M.S; Jepsen, S.; Jin, L.; Otomo-Corgel, J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J. Clin. Periodontol.* (2017) 44, 456–462.
10. Treves-Manusevitz, S.; Hoz, L.; Rachima, H.; Montoya, G.; Tzur, E.; Vardimon, A.; Narayanan, A.S.; Amar, S.; Arzate, H.; Pitaru, S. Stem cells of the lamina propria of human oral mucosa and gingiva develop into mineralized tissues *in vivo*. *J. Clin. Periodontol.* (2013) 40, 73–81.
11. Alvarez, M.; Narayanan, S.; Zeichner-David, M.; Carmona, B.; Arzate, H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* (2006) 38, 409–419.
12. Valdés De Hoyos, A.; Hoz-Rodríguez, L.; Arzate, H.; Narayanan, A.S. Isolation of protein-tyrosine phosphatase-like member-a variant from cementum. *J. Dent. Res.* (2012) 91, 203–209.
13. Hoz, L.; Romo, E.; Zeichner-David, M.; Sanz, M.; Nuñez, J.; Gaitán, L.; Mercado, G.; Arzate, H. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol. Int.* (2012) 36, 129–136.
14. Nuñez, J.; Sanz-Blasco, S.; Vignoletti, F.; Muñoz, F.; Arzate, H.; Villalobos, C.; Nuñez, L.; Cazesse, R.G.; Sanz, M. Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells. *J. Periodontal Res.* (2012) 47, 33–44.
15. Komaki, M.; Iwasaki, K.; Arzate, H.; Narayanan, A.S.; Izumi, Y.; Morita, I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J. Cell Physiol.* (2012) 227, 649–657.
16. Romo-Arévalo E, Arzate H, Montoya-Ayala G, Rodríguez-Romero A. High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 with lectin activity. *FEBS Lett.* (2016) 590:1,129-38.
17. Serrano J, Romo E, Bermúdez M, Narayanan AS, Zeichner-David M, Santos L, Arzate H. Bone regeneration in rat cranium critical-size defects induced by Cementum Protein 1 (CEMP1). *PLoS One.* (2013).
18. Montoya, G.; Correa, R.; Arenas, J.; Hoz, L.; Romo, E.; Arroyo, R.; Zeichner-David, M.; Arzate, H. Cementum protein 1-derived peptide (CEMP 1-p1) modulates hydroxyapatite crystal formation *in vitro*. *J. Pept. Sci.* (2019), 25, e321.
19. Correa, R.; Arenas, J.; Montoya, G.; Hoz, L.; López, S.; Salgado, F.; Arroyo, R.; Salmeron, N.; Romo, E.; Zeichner-David, M.; et al. Synthetic cementum protein 1-derived peptide regulates mineralization *in vitro* and promotes bone regeneration *in vivo*. *FASEB J.* (2019) 33, 1167–1178.
20. López Letayf Sonia. Células Troncales Derivadas de la Lámina Propia de la Mucosa Bucal: su potencial en la regeneración ósea *in vivo*. 2017. Tesis de Maestría.
21. Miyoshi K, Tsuji D, Kudoh K. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Buccal Mucosa. *J Biosci Bioeng* (2010) 110:3, 345-350





22. Glim J, Everts V, Niessen F, et al. Extracellular matrix components of oral mucosa differ from skin and resemble that of fetal skin. *Archives of oral biology*. (2014) 59, 1048-1055
23. Szpaderska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA, Differential injury response in oral mucosal and cutaneous wound. *J Dent Res*. (2003), 82:8, 621-626
24. Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, et al. The lamina Propria of Adult Human Buccal Mucosa Harbors a Novel Stem Cell Population. *Stem Cells*. (2010) 28, 984-995.
25. Mbalaviele, G., Sheikh, S., Stains, J.P., Salazar, V.S., Cheng, S.L., Chen, D., and Civitelli, R.  $\beta$ -Catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation. *J. Cell. Biochem*. (2005) 94, 403–418.
26. Nusse R., Brown A., Papkoff J., Scambler P., Shackleford G., McMahon A., Moon R., Varmus H. A new nomenclature for *int-1* and related genes: The *Wnt* gene family. *Cell*. (1991) 64-231
27. Teo, J.L., Kahn, M. The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: a tale of two coactivators. *Adv. Drug Deliv. Rev*. (2010) 62, 1149–1155.
28. Kim, J.H., Liu, X., Wang, J., Chen, X., Zhang, H., Kim, S.H., Cui, J., Li, R., Zhang, W., Kong, Y., Zhang, J., Shui, W., Lamplot, J., Rogers, M.R., Zhao, C., Wang, N., Rajan, P., Tomal, J., Statz, J., Wu, N., Luu, H.H., Haydon, R.C., He, T.C. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther. Adv. Musculoskelet Dis*. (2013) 5, 13–31.
29. Xue Zhang<sup>1</sup> et. Al. Apigenin promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through JNK and p38 MAPK pathways. *Mol Cell Biochem* (2015) 407, 41–50.
30. Bo Lia,<sup>b,1</sup>, Ru-Yin Hua,<sup>1</sup>, Li Suna,<sup>1</sup>, Rui Luoa, Kai-Hang Lua, Xiao-Bin Tiana. Potential role of andrographolide in the proliferation of osteoblasts mediated by the ERK signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. (2016) 83, 1335–1344
31. Baron R, Rawadi G. Wnt signaling and the regulation of bone mass. *Curr Osteoporos Rep*. (2007) 5, 73-80.
32. Raisz LG, Rodan GA. Pathogenesis of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. (2003) 32, 15-24.
33. Nusse R., Varmus H.E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. (1982) 31, 99–109.
34. Van Ooyen A., Nusse R. Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene *int-1*; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell*. (1984) 39, 233–240.
35. Rijsewijk F., Schuermann M., Wagenaar E., Parren P., Weigel D., Nusse R. The drosophila homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*. (1987) 50, 649–657.
36. Kim, J.H., Liu, X., Wang, J., Chen, X., Zhang, H., Kim, S.H., Cui, J., Li, R., Zhang, W., Kong, Y., Zhang, J., Shui, W., Lamplot, J., Rogers, M.R., Zhao, C., Wang, N., Rajan, P., Tomal, J., Statz, J., Wu, N., Luu, H.H., Haydon, R.C., He, T.C. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther. Adv. Musculoskelet Dis*. (2013) 5, 13–31.
37. Clevers, H. and Nusse, R. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Disease». *Cell* (2012) 149:6, 1192-1205.
38. Clevers, H. and Nusse, R. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* (2017) 169:6, 985-999.
39. Korzh, V. Winding roots of Wnts. *Zebrafish* (2008) 5:3, 159-68
40. Willert, Karl; Nusse, Roel. Wnt proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. (2012). ISSN 1943-0264.
41. Bhat, SG; Babu, P. Wingless mutation in *Drosophila melanogaster*. *J Biosci*. (1987) 12:1, 1-11
42. R.P. Sharma. Wingless to Wnt: discovery of conserved cell signaling gene family in the animal kingdom. *Current Science*. (2013) 104:9, 1140-51.
43. Pai, Sachin. Carneiro, Benedito and Mota, Jose Mauricio and Costa, Ricardo and Leite, Caio and Barroso-Sousa, Romualdo and Kaplan, Jason and Chae, Young and Giles, Frank. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway: Modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology and Oncology*. (2017)
44. Luan, X., Ito, Y., Dangaria, S., and Diekwisch, T.G. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev*. (2006) 15, 595–608.
45. Caddy J., Wilanowski T., Darido C., Dworkin S., Ting S.B., Zhao Q., Rank G., Auden A., Srivastava S., Papenfuss T.A., et al. Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway. *Dev. Cell*. (2010) 19, 138–147.
46. Murdoch J.N., Damrau C., Paudyal A., Bogani D., Wells S., Greene N.D., Stanier P., Copp A.J. Genetic interactions between planar cell polarity genes cause diverse neural tube defects in mice. *Dis. Models Mech*. (2014) 7, 1153–1163.
47. Babayeva S., Zilber Y., Torban E. Planar cell polarity pathway regulates actin rearrangement, cell shape, motility, and nephrin distribution in podocytes. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol*. (2011) 300, 549-560.





48. Boutin C., Labedan P., Dimidschstein J., Richard F., Cremer H., Andre P., Yang Y., Montcouquiol M., Goffinet A.M., Tissir F. A dual role for planar cell polarity genes in ciliated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2014)111, 3129–3138.
49. Kinoshita N., Iioka H., Miyakoshi A., Ueno N. PKC $\delta$  is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates *Xenopus* convergent extension movements. *Genes Dev.* (2003) 17, 1663–1676.
50. Fanto M., Weber U., Strutt D.I., Mlodzik M. Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the *Drosophila* eye. *Curr. Biol.* (2000) 10, 979–988.
51. Slusarski D.C., Corces V.G., Moon R.T. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature.* (1997) 390, 410–413.
52. Kuhl M., Sheldahl L.C., Malbon C.C., Moon R.T. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J. Biol. Chem.* (2000) 275, 12701–12711.
53. Sheldahl L.C., Park M., Malbon C.C., Moon R.T. Protein Kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr. Biol.* (1999) 9, 695–698.
54. Kuhl M., Geis K., Sheldahl L.C., Pukrop T., Moon R.T., Wedlich D. Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling. *Mech. Dev.* (2001) 106, 61–76.
55. Okamoto K., Narayanan R., Lee S.H., Murata K., Hayashi Y. The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2007) 104, 6418–6423.
56. Wang Q., Symes A.J., Kane C.A., Freeman A., Nariculam J., Munson P., Thrasivoulou C., Masters J.R., Ahmed A. A novel role for Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling in actin cytoskeleton remodeling and cell motility in prostate cancer. *PLoS ONE.* (2010) 5.
57. Pereira C., Schaer D.J., Bachli E.B., Kurrer M.O., Schoedon G. Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2008) 28, 504–510.
58. Gordon, M.D.; Nusse, R. Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* (2006) 281, 22429–22433.
59. Moon, R.T.; Kohn, A.D.; De Ferrari, G.V.; Kaykas, A. WNT and beta-catenin signalling: Diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* (2004) 5, 691–701.
60. Stadel, R.; Ho\_mans, R.; Basler, K. Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Curr. Biol.* (2006) 16, 378–385.
61. Feng, Z.; Srivastava, A.S.; Mishra, R.; Carrie, E.A. Regulatory role of Wnt signaling pathway in the hematopoietic differentiation of murine embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004) 324, 1333–1339.
62. Sato, N.; Meijer, L.; Skaltsounis, L.; Greengard, P.; Brivanlou, A.H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* (2004) 10, 55–63.
63. Liu, Z.; Habener, J.F. Glucagon-like Peptide-1 Activation of TCF7L2-dependent Wnt Signaling Enhances Pancreatic Beta Cell Proliferation. *J Biol Chem.* (2008) 283, 8723–8735.
64. Willert, K.; Jones, K.A. Wnt signaling: Is the party in the nucleus?. *Genes Dev.* (2006) 20, 1394–1404
65. Evans, J.S. “Tuning in” to mollusk shell nacre- and prismatic-associated protein terminal sequences. Implications for biomineralization and the construction of high-performance inorganic-organic composites. *Chem Rev.* (2008) 108, 4455–4462.
66. Nudelman, F.; Chen, H.H.; Goldberg, H.A.; Weiner, S.; Addadi, L. Spiers Memorial Lecture Lessons from biomineralization: comparing the growth strategies of mollusc shell prismatic and nacreous layers in *Atrina rigida*. *Faraday Discuss.* 2007, 136, 9–25. [CrossRef] [PubMed]
67. Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J. Cell Biochem.* (2006) 99, 1233–1239.
68. Choi, J.W.; Jeong, W.S.; Yang, S.J.; Park, E.J.; Oh, T.S.; Koh, K.S. Appropriate and effective dosage of BMP-2 for the ideal regeneration of calvarial bone defects in beagles. *Plast Reconstr. Surg.* (2016), 138, 64–72.
69. Carstanjen, B.; Desbois, C.; Hekmati, M.; Behr, L. Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse. *Can. J. Vet. Res.* (2006) 70, 143–147.
70. Bergman, R.J.; Gazit, D.; Kahn, A.J.; Gruber, H.; McDougall, S.; Hahn, T.J. Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. *J. Bone Miner. Res.* (1996)11, 568–577.



71. Grigoriadis, A.E.; Heersche, J.N.; Aubin, J.E. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J. Cell Biol.* (1988) 106, 2139–2151.
72. Johnstone, B.; Hering, T.M.; Caplan, A.I.; Goldberg, V.M.; Yoo, J.U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.* (1998) 238, 265–272.
73. Kadiyala, S.; Young, R.G.; Thiede, M.A.; Bruder, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* (1997) 6, 125–134.
74. Zhang, H.; Li, H. Tricin enhances osteoblastogenesis through the regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in human mesenchymal stem cells. *Mech Dev.* (2018) 152, 38–43.
75. De Boer, J.; Wang, H.J.; Van Blitterswijk, C. Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* (2004) 10, 393–401.
76. Zhang, Y.; Xie, R.L.; Croce, C.M.; Stein, J.L.; Lian, J.B.; van Wijnen, A.J.; Stein, G.S. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2011) 108, 9863–9868.
77. Sun, S.; Wang, Z.; Hao, Y. Osterix overexpression enhances osteoblast differentiation of muscle satellite cells in vitro. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* (2008) 37, 350–356.
78. Chen, J.K.; Shapiro, H.S.; Wrana, J.L.; Reimers, S.; Heersche, J.N.; Sodek, J. Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization. *Matrix* (1991) 11, 133–143.
79. Hunter, G.K.; Goldberg, H.A. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1993) 90, 8562–8565.
80. Hunter, G.K.; Hauschka, P.V.; Poole, R.A.; Rosenberg, L.C.; Goldberg, H.A. Nucleation and inhibition of Hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem. J.* (1996) 317, 59–64.
81. Hough, T.A.; Polewski, M.; Johnson, K.; Cheeseman, M.; Nolan, P.M.; Vizer, L.; Rastan, S.; Boyde, A.; Pritzker, K.; Hunter, A.J.; et al. Novel mouse model of autosomal semi dominant adult hypophosphatasia has a splice site mutation in the tissue nonspecific alkaline phosphatase gene *Akp2*. *J. Bone Miner. Res.* (2007) 22, 1397–1407.
82. Thomas, G.P.; Baker, S.U.; Eisman, J.A.; Gardiner, E.M. Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. *J. Endocrinol.* (2002) 170, 451–460.
83. Tang, N.; Song, W.X.; Luo, J.; Luo, X.; Chen, J.; Shar, K.A.; Bi, Y.; He, B.C.; Huang, J.Y.; Zhu, G.H.; et al. BMP-9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *J. Cell Mol. Med.* (2009) 13, 2448–2464.
84. Deng, Z.L.; Shar, K.A.; Tang, N.; Song, W.X.; Luo, J.; Luo, X.; Chen, X.; Bennett, E.; Reid, R.; Manning, D.; et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front. Biosci.* (2008) 13, 2001–2021.
85. Karsenty, G.; Wagner, E.F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell.* (2002) 2, 389–406.
86. Molofsky, A.V.; Pardoll, R.; Morrison, S.J. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr. Opin. Cell Biol.* (2004) 16, 700–707.
87. Wang, J.; Wynshaw-Boris, A. The canonical Wnt pathway in early mammalian embryogenesis and stem cell maintenance/ differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (2004) 14, 533–539.
88. Kleber, M.; Sommer, L. Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* (2004) 16, 681–687.
89. Reya, T.; Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* (2005) 434, 843–850.
90. Luo, J.; Chen, J.; Deng, Z.L.; Luo, X.; Song, W.X.; Shar, K.A.; Tang, N.; Haydon, R.C.; Luu, H.H.; He, T.C. Wnt signaling and human diseases: What are the therapeutic implications? *Lab. Invest.* (2007) 87, 97–103.
91. Wang, H.; Charles, P.C.; Wu, Y.; Ren, R.; Pi, X.; Moser, M.; Barshishat-Kupper, M.; Rubin, J.S.; Perou, C.; Bautch, V.; et al. Gene expression profile signatures indicate a role for Wnt signaling in endothelial commitment from embryonic stem cells. *Circ. Res.* (2006) 98, 1331–1339.
92. Paling, N.R.; Wheadon, H.; Bone, H.K.; Welham, M.J. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* (2004) 279, 48063–48070.
93. Cadigan, K.M.; Nusse, R. Wnt signaling: A common theme in animal development. *Genes Dev.* (1997) 11, 3286–3305.
94. Glass, D.A.; Karsenty, G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology.* (2007) 148, 2630–2634.
95. Bergwitz, C.; Wendlandt, T.; Kispert, A.; Brabant, G. Wnts differentially regulate colony growth and differentiation of chondrogenic rat calvaria cells. *Biochim. Biophys. Acta.* (2001) 1538, 129–140.
96. Fischer, L.; Boland, G.; Tuan, R.S. Wnt signaling during BMP- stimulation of mesenchymal chondrogenesis. *J. Cell Biochem.* (2002) 84, 816–831.



97. Glass, D.A.; Karsenty, G. Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. *Curr. Top. Dev. Biol.* (2006) 73, 43–84.
98. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* (2006) 127, 469–480.
99. He, T.C.; Sparks, A.B.; Rago, C.; Hermeking, H.; Zawel, L.; da Costa, L.T.; Morin, P.J.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* (1998) 281, 1509–1512.
100. Tetsu, O.; McCormick, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature.* (1999) 398, 422–426.
101. He, T.C.; Chan, T.A.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. PPAR delta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell.* (1999) 99, 335–345.
102. Qu, Z.H.; Zhang, X.L.; Tang, T.T.; Dai, K.R. Promotion of osteogenesis through beta-catenin signaling by desferrioxamine. *Biochem. Biophys Res. Commun.* (2008) 370, 332–337.
103. Bain, G.; Muller, T.; Wang, X.; Papko, J. Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) 301, 84–91.
104. Jackson, A.; Vayssiere, B.; Garcia, T.; Newell, W.; Baron, R.; Roman-Roman, S.; Rawadi, G. Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells. *Bone.* (2005) 36, 585–598.
105. Chang, J.; Sonoyama, W.; Wang, Z.; Jin, Q.; Zhang, C.; Krebsbach, P.H.; Giannobile, W.; Shi, S.; Wang, C.Y. Noncanonical Wnt-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* (2007) 282, 30938–30948.
106. Gaur, T.; Lengner, C.J.; Hovhannisyan, H.; Bhat, R.A.; Bodine, P.V.; Komm, B.S.; Javed, A.; van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Stein, G.S.; et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J. Biol. Chem.* (2005) 280, 33132–33140.
107. Day, T.F.; Guo, X.; Garrett-Beal, L.; Yang, Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell.* (2005) 8, 739–750.
108. Dietrich, L.; Rathmer, B.; Ewan, K.; Bange, T.; Heinrichs, S.; Dale, T.C.; Schade, D.; Grossmann, T.N. Cell Permeable Stapled Peptide Inhibitor of Wnt Signaling that Targets  $\beta$ -Catenin Protein-Protein Interactions. *Cell Chem. Biol.* (2017) 24, 958–968.
109. Ziegler, A. Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2008) 60, 580–594.
110. Gallivan, J.P.; Dougherty, D.A. Cation- $\pi$  interactions in structural biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1999) 96, 9459–9464.
111. Persson, S.; Killian, J.A.; Lindblom, G. Molecular ordering of interfacially localized tryptophan analogs in ester- and ether-lipid bilayers studied by 2H-NMR. *Biophys. J.* (1998) 75, 1365–1371.
112. Qian, Z.; Martyna, A.; Hard, R.L.; Wang, J.; Appiah-Kubi, G.; Coss, C.; Phelps, M.A.; Rossman, J.S.; Pei, D. Discovery and mechanism of highly efficient cyclic cell-penetrating peptides. *Biochemistry.* (2016) 55, 2601–2612.
113. Brock, R. The uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides: putting the puzzle together. *Bioconjug. Chem.* (2014) 25, 863–868.
114. MacDonald, B.T.; Tamai, K.; He, X. Wnt/beta-catenin signaling: Components, mechanisms and diseases. *Dev. Cell.* (2009) 17, 9–26.
115. Peterson-Nedry, W.; Erdeniz, N.; Kremer, S.; Yu, J.; Baig-Lewis, S.; Wehrli, M.; Baig-Lewis, S.; Wehrli, M. Unexpectedly robust assembly of the Axin destruction complex regulates Wnt/Wg signaling in *Drosophila* revealed by analysis in vivo. *Dev. Biol.* (2008) 320, 226–241.
116. Salins, P.; Shawesh, S.; He, Y.; Dibrov, A.; Kashour, T.; Arthur, G.; Amara, F. Lovastatin protects human neurons against A $\beta$ -induced toxicity and causes activation of beta-catenin-TCF/LEF signaling. *Neurosci. Lett.* (2007) 412, 211–216.
117. Sun, Y.C. Examination of effects of GSK3 $\beta$  phosphorylation,  $\beta$ -catenin phosphorylation and  $\beta$ -catenin degradation on kinetics of Wnt signaling pathway using computational method. *Theor. Biol. Med. Model.* (2009) 6, 13.
118. Escobar-Gómez, E. Jódar, F. Hawkins. Wnt receptor: Physiology and potential new therapeutic targets. (2009) 18:2, 39–44.
119. Baron R, Rawadi G. Wnt signaling and the regulation of bone mass. *Curr. Osteoporos Rep.* (2007) 5, 73–80.
120. Du, Y., Ling, J., Wei, X., Ning, Y., Xie, N., Gu, H., Yang, F. Wnt/beta-catenin signaling participates in cementoblast/osteoblast differentiation of dental follicle cells. *Connect. Tissue Res.* (2012) 53, 390–397.



121. Chester M. Hedgepeth, Leslee J. Conrad, Jie Zhang, Hui-Chuan Huang, Virginia M. Y. Lee and Peter S. Klein. Activation of the Wnt Singaling Pathway: A Molecular Mechanism for Lithium Action. *Developmental Biology*. (1997) 185, 82-91.
122. Tian, H., Lv, P., Ma, K., Zhou, C., and Gao, X.  $\beta$ -Catenin/LEF1 activated enamelin expression in ameloblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2010) 398, 519–524.
123. Rattanaworawipa, P., Osathanon, T., Pavasant, P., Sukarawan, W. Activation of Wnt pathway by lithium chloride suppresses proliferation and c-fos mRNA expression in human deciduous dental pulp cells. *CU Dent. J.* (2015) 38, 21–28.
124. Fu, Y., Zheng, Y., Chan, K.G., Liang, A., Hu, F. Lithium chloride decreases proliferation and migration of C6 glioma cells harboring isocitrate dehydrogenase 2 mutant via GSK-3beta. *Mol. Biol. Rep.* (2014) 41, 3907–3913.
125. Chester M. Hedgepeth, Leslee J. Conrad, Jie Zhang, Hui-Chuan Huang, Virginia M. Y. Lee and Peter S. Klein. Activation of the Wnt Singaling Pathway: A Molecular Mechanism for Lithium Action. *Developmental Biology*. (1997) 185, 82-91.
126. Heo, J.S., Lee, S.Y., Lee, J.C. Wnt/beta-catenin signaling enhances osteoblastogenic differentiation from human periodontal ligament fibroblasts. *Mol. Cells.* (2010) 30, 449–454
127. Tian, H., Lv, P., Ma, K., Zhou, C., and Gao, X.  $\beta$ -Catenin/LEF1 activated enamelin expression in ameloblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2010) 398, 519–524.
128. Xie X, Wang J, Wang K, Li C, Zhang S, Jing D, Xu C, Wang X, Zhao H, Feng JQ. Axin2<sup>+</sup>-Mesenchymal PDL Cells, Instead of K14<sup>+</sup> Epithelial Cells, Play a Key Role in Rapid Cementum Growth. *J Dent Res.* (2019) 98:11, 1262-1270.