

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

LUCIANA FERNANDES DE OLIVEIRA

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL HUMANO**

SÃO PAULO

2025

LUCIANA FERNANDES DE OLIVEIRA

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Carleto Andia

SÃO PAULO

2025

Oliveira, Luciana Fernandes de.

Regulação epigenética de células mesenquimais do ligamento periodontal humano / Luciana Fernandes de Oliveira. - 2025.

15 f. : il. color.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2025.

Área de concentração: Clínica Odontológica. Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Denise Carleto Andia.

1. EZH2. 2. KDM6B. 3. H3K27me3. 4. *RUNX2*. 5. *SP7*.
6. Osteogênese. 7. Epigenética. 8. Cromatina. 9. PDLcs. I. Andia, Denise Carleto (orientadora). II. Título.

LUCIANA FERNANDES DE OLIVEIRA

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Profª. Denise Carleto Andia
Universidade Paulista – UNIP

Prof. Rodrigo A da Silva
Universidade Paulista – UNIP

Prof. Laurindo Borelli Neto
Universidade Paulista – UNIP

Profª. Marina Damasceno e Souza de Carvalho Chiari
Universidade Paulista – UNIP

Prof. Andrea Anido Anido
Universidade Paulista – UNIP

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família:

Meu marido Eduardo, meus pais Joaquim e Alexandra, meus irmãos Adriana/Ralph e Dário/Renata, meus sobrinhos Vinicius/Vivian, Giovanna, Larissa, Victoria, Verena e Murilo.

São meu esteio e dádiva de Deus. Presentes mesmo na minha ausência.

Agradecimento

À Deus sempre e sobre todas as coisas

À CAPS - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa fomento que apoiou meus estudos neste curso.

À minha orientadora Profa. Denise Carleto Andia, que com generosidade, me estendeu a oportunidade de desenvolvimento e conhecimento, assim como a conclusão deste doutorado. Meu respeito e admiração.

Ao Prof. Rodrigo Augusto da Silva por ter conduzido, de maneira crucial, juntamente a minha orientadora, meus mais importantes aprendizados.

À técnica de laboratório Natália Bispo Vieira de Melo, pelo fundamental auxílio em meu trabalho e principalmente pela dedicação e carinho com que o fez.

Aos professores deste programa de pós-graduação pela excelência das aulas ministradas.

Aos professores que fizeram parte da banca, meu muito obrigada, pela disposição em contribuir com meu trabalho.

Aos amigos Borelli e Andrea, pela amizade e ensinamentos por toda minha caminhada.

Aos funcionários da Universidade Paulista – Unip que sempre com sorriso no rosto, tornaram os dias mais leves e agradáveis.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”.*

Oliver Wendell Holmes Sr. / Albert Einstein

RESUMO

Introdução: Células-tronco mesenquimais derivadas do ligamento periodontal (PDLCs) exibem forte capacidade de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens, sustentando seu potencial em terapias regenerativas. No entanto, em condições osteogênicas, as PDLCs podem manifestar fenótipos distintos, regulados por mecanismos epigenéticos que influenciam a acessibilidade da cromatina e a expressão gênica. Este estudo teve como objetivo investigar a regulação epigenética de PDLCs com alto e baixo potencial osteogênico, h-PDLCs e l-PDLCs, respectivamente.

Métodos: Foram avaliadas a expressão de mRNA por PCR em tempo real, a presença de proteína por imunofluorescência, os níveis de proteína por Western Blotting e a regulação do complexo cromatina/DNA por imunoprecipitação da cromatina em PDLCs cultivadas em condições basais (DMEM, T0) e após indução osteogênica por 3 e 10 dias (T3 e T10).

Resultados: No estado basal, h-PDLCs e l-PDLCs apresentaram perfis transcricionais, proteicos e epigenéticos distintos. Durante a estimulação osteogênica, a expressão de *EZH2* aumentou significativamente em l-PDLCs, mas diminuiu em h-PDLCs ($p < 0,001$), enquanto a expressão de *KDM6B* diminuiu em l-PDLCs e aumentou em h-PDLCs ($p < 0,0001$). A análise de *RUNX2*, *RUNX2p57* e *SP7* revelou alterações transcricionais dinâmicas: *RUNX2p57* e *SP7* foram regulados negativamente em l-PDLCs, enquanto *RUNX2* foi regulado positivamente em h-PDLCs em T3 e T10. Adicionalmente, l-PDLCs mostraram maior acúmulo da marca repressiva de histonas H3K27me3, com enriquecimento significativo nos promotores de *RUNX2* e *SP7* em comparação com h-PDLCs durante a indução osteogênica ($p < 0,05$).

Conclusão: Estes achados destacam o papel crítico do equilíbrio entre EZH2/KDM6B e da dinâmica de H3K27me3 na regulação do potencial osteogênico de PDLCs e destacam a importância do controle epigenético no comprometimento da linhagem osteogênica.

Palavras-chave: EZH2; KDM6B; H3K27me3; *RUNX2*, *SP7*; osteogênese; epigenética; cromatina; PDLCs.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	8
CONCLUSÃO GERAL.....	10
REFERÊNCIAS	11

INTRODUÇÃO

A cavidade oral emergiu como uma rica fonte de células-tronco mesenquimais (MSCs), presentes em diversos tecidos orais, como dentes decíduos esfoliados (SHEDs), gengiva (GMSCs), polpa dentária (DPSCs) e ligamento periodontal (PDLs). Coletivamente, essas células passaram a ser denominadas MSCs derivadas de dentes (DMSCs) e apresentam multipotencialidade comparável às MSCs da medula óssea, com capacidade de diferenciação em odontoblastos, cementoblastos e adipócitos, além de destacada atividade imunomodulatória (Hargreaves *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2021). Dentre essas, as PDLs demonstram notável capacidade de autorrenovação e diferenciação multipotente, o que as torna particularmente promissoras para aplicações em engenharia tecidual óssea e dentária (Cabaña-Munhoz *et al.*, 2023). PDLs exibem maior taxa proliferativa do que células-tronco derivadas do tecido adiposo, além de propriedades angiogênicas que reforçam seu potencial terapêutico em abordagens regenerativas (Yeasmin *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2022).

Para que estratégias terapêuticas sejam eficazes, é fundamental que as PDLs se diferenciem em osteoblastos capazes de promover deposição mineral. Contudo, essas células apresentam variabilidade interindividual em seu potencial osteogênico (Assis *et al.*, 2021a, 2021b e 2022; Ferreira *et al.*, 2022, 2023 e 2024; Adolpho *et al.*, 2022). Estudos anteriores revelaram que, em condições osteoindutivas, as PDLs podem adotar fenótipos distintos, com elevado (h-PDLs) ou reduzido (l-PDLs) potencial de mineralização. Publicações prévias do nosso grupo de pesquisa demonstrou que l-PDLs apresentam hipermetilação em genes osteogênicos, prejudicando sua diferenciação e retardando a mineralização (Assis *et al.*, 2021b e 2022; Ferreira *et al.*, 2021).

Os genes RUNX Family Transcription Factor 2 (*RUNX2*) e SP7 Transcription Factor (*SP7*) são os principais reguladores transcricionais da diferenciação osteoblástica e possuem expressão rigidamente controlada durante o comprometimento das MSCs com a linhagem osteogênica. A isoforma *RUNX2/p57* é particularmente relevante na definição do fenótipo osteoblástico e está sob complexo controle epigenético, mediado por mecanismos ativadores e repressivos (Ducy *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2014; Tai *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2015; Aguilar *et al.*, 2016). Estudos genéticos demonstraram que a ausência de *RUNX2* ou *SP7* compromete totalmente a formação óssea, evidenciando sua importância no desenvolvimento esquelético embrionário e nos distúrbios ósseos humanos (Mundlos *et al.*, 1997; Lapunzina *et al.*, 2010). Além disso, a deficiência de *SP7* impede a diferenciação de

precursores que expressam *RUNX2* (Zhou *et al.*, 2010). Dessa forma, *RUNX2* e *SP7* constituem reguladores-chave do destino osteogênico (Montecino *et al.*, 2021).

O potencial osteogênico das MSCs é regulado por mecanismos epigenéticos que controlam a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA, modulando a organização e a estrutura da cromatina. Na cromatina, o DNA associa-se a octâmeros de histonas formando os nucleossomos, cujas caudas (principalmente de H3 e H4) podem sofrer metilação ou acetilação (Li *et al.*, 2007). Essas modificações, mediadas por enzimas específicas, ativam ou reprimem a transcrição gênica. Os complexos repressivos Polycomb 1 e 2 (PRC1 e PRC2) são os principais mediadores do silenciamento da cromatina. O Enhancer of Zeste Homologue 2 (EZH2), subunidade catalítica do PRC2, catalisa a trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3), uma marca associada à repressão transcricional e à compactação da cromatina (Yu *et al.*, 2008; Voigt *et al.*, 2013; Samsonraj *et al.*, 2018). Em contraposição, desmetilases como KDM6B (também denominada Jmjd3) promovem a remoção dessa marca, revertendo a cromatina a um estado transcionalmente ativo. A inibição da metilação de histonas demonstrou restaurar a expressão de *RUNX2* e *SP7*, aumentar a atividade da fosfatase alcalina e promover deposição mineral detectável por coloração com vermelho de alizarina (Gopinathan *et al.*, 2013; Montecino *et al.*, 2021).

A marca H3K27me3 é, portanto, crucial no silenciamento de genes ligados à osteogênese. Sua remoção dos promotores de genes como *RUNX2* e *SP7* é necessária para que a diferenciação osteoblástica ocorra. Estudos demonstraram que a superexpressão de *KDM6B* aumenta a atividade da fosfatase alcalina e a mineralização *in vitro* em MSCs humanas (Ye *et al.*, 2012). As desmetilases KDM6A e KDM6B são específicas para H3K27me3 e me2, catalisando sua conversão em H3K27me1, uma transição que favorece a ativação gênica. Jmjd3 tem papel relevante em processos como diferenciação celular, inflamação e tumorigênese, regulando diversos fatores transcricionais (Yang *et al.*, 2017; Montecino *et al.*, 2021).

Análises epigenômicas e transcriptômicas comparando h-PDLCs e l-PDLCs identificaram *EZH2* e *KDM6B* como genes candidatos à regulação diferencial da osteogênese, modulando a acessibilidade da cromatina e a expressão de genes relacionados à mineralização (Assis *et al.*, 2022). O entendimento desses mecanismos regulatórios é essencial para elucidar as vias moleculares envolvidas no comprometimento osteogênico de PDLCs e pode subsidiar o desenvolvimento de terapias regenerativas com maior precisão.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a regulação epigenética na aquisição de fenótipos osteogênicos distintos durante a diferenciação osteogênica em PDLCs.

CONCLUSÃO GERAL

Este estudo fornece novas evidências sobre os mecanismos epigenéticos que regulam a heterogeneidade de mineralização, demonstrando que a interação dinâmica entre *EZH2*, *KDM6B* e a modificação epigenética H3K27me3 desempenha um papel na modulação do comprometimento osteogênico. A expressão aumentada de *EZH2* e o enriquecimento de H3K27me3 nas regiões promotoras de *RUNX2* e *SP7* podem estar associados à redução da sua expressão gênica, sustentando um estado de cromatina transcricionalmente. O enriquecimento de H3K27me3 em regiões promotoras específicas reforça o caráter gênico e regionalmente específico dessa regulação.

Com este estudo, destaca-se a relevância dos mecanismos epigenéticos, baseados na organização da cromatina, no controle do fenótipo das PDLCs, estabelecendo-se bases para futuros estudos translacionais voltados à regeneração óssea e periodontal por meio da modulação epigenética.

REFERÊNCIAS

1. Adolpho LF, Lopes HB, Freitas GP, Weffort D, Campos Totoli GG, Loyola Barbosa AC, Freire Assis RI, Silverio Ruiz KG, Andia DC, Rosa AL, Beloti MM. Human periodontal ligament stem cells with distinct osteogenic potential induce bone formation in rat calvaria defects. *Regen Med.* 2022 Jun; 17(6):341-353. doi: 10.2217/rme-2021-0178. Epub 2022 Mar 16. PMID: 35291805.
2. Aguilar R, Bustos FJ, Saez M, Rojas A, Allende ML, van Wijnen AJ, van Zundert B, Montecino M. Polycomb PRC2 complex mediates epigenetic silencing of a critical osteogenic master regulator in the hippocampus. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Aug; 1859(8):1043-55. doi: 10.1016/j.bbagr.2016.05.009. Epub 2016 May 20. PMID: 27216774; PMCID: PMC4958507.
3. Assis RIF, Feltran GDS, Silva MES, Palma ICDR, Rovai ES, Miranda TB, Ferreira MR, Zambuzzi WF, Birbrair A, Andia DC, da Silva RA. Non-coding RNAs repressive role in post-transcriptional processing of RUNX2 during the acquisition of the osteogenic phenotype of periodontal ligament mesenchymal stem cells. *Dev Biol.* 2021 Feb; 470:37-48. doi: 10.1016/j.ydbio.2020.10.012. Epub 2020 Nov 2. PMID: 33152274.
4. Assis RIF, Racca F, Ferreira RS, Ruiz KGS, da Silva RA, Clokie SJH, Wiench M, Andia DC. Osteogenic Commitment of Human Periodontal Ligament Cells Is Predetermined by Methylation, Chromatin Accessibility and Expression of Key Transcription Factors. *Cells.* 2022 Mar 26; 11(7):1126. doi: 10.3390/cells11071126. PMID: 35406691; PMCID: PMC8997528.
5. Assis RIF, Schmidt AG, Racca F, da Silva RA, Zambuzzi WF, Silvério KG, Nociti FH Jr, Pecorari VG, Wiench M, Andia DC. DNMT1 Inhibitor Restores RUNX2 Expression and Mineralization in Periodontal Ligament Cells. *DNA Cell Biol.* 2021 May; 40(5):662-674. doi: 10.1089/dna.2020.6239. Epub 2021 Mar 22. PMID: 33751901.
6. Cabaña-Muñoz ME, Pelaz Fernández MJ, Parmigiani-Cabaña JM, Parmigiani Izquierdo JM, Merino JJ. Adult Mesenchymal Stem Cells from Oral Cavity and Surrounding Areas: Types and Biomedical Applications. *Pharmaceutics.* 2023 Aug 9; 15(8):2109. doi: 10.3390/pharmaceutics15082109. PMID: 37631323; PMCID: PMC10459416.

7. Ducky P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30; 89(5):747-54. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80257-3. PMID: 9182762.

8. Ferreira RS, Assis RIF, Feltran GDS, do Rosário Palma IC, Françoso BG, Zambuzzi WF, Andia DC, da Silva RA. Genome-wide DNA (hydroxy) methylation reveals the individual epigenetic landscape importance on osteogenic phenotype acquisition in periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 2022 Mar; 93(3):435-448. doi: 10.1002/JPER.21-0218. Epub 2021 Aug 16. PMID: 34291826.

9. Ferreira RS, Assis RIF, Racca F, Bontempi AC, da Silva RA, Wiench M, Andia DC. Analyzes In Silico Indicate the lncRNAs MIR31HG and LINC00939 as Possible Epigenetic Inhibitors of the Osteogenic Differentiation in PDLCS. *Genes (Basel)*. 2023 Aug 18; 14(8):1649. doi: 10.3390/genes14081649. PMID: 37628700; PMCID: PMC10454380.

10. Ferreira RS, da Silva RA, Feltran GDS, da Silva EP, de Assis RIF, Rovai ES, Zambuzzi WF, Andia DC. *JARID1B* represses the osteogenic potential of human periodontal ligament mesenchymal cells. *Oral Dis*. 2024 Sep; 30(6):3971-3981. doi: 10.1111/odi.14814. Epub 2023 Nov 22. PMID: 37994179.

11. Gopinathan G, Kolokythas A, Luan X, Diekwisch TG. Epigenetic marks define the lineage and differentiation potential of two distinct neural crest-derived intermediate odontogenic progenitor populations. *Stem Cells Dev*. 2013 Jun 15; 22(12):1763-78. doi: 10.1089/scd.2012.0711. Epub 2013 Mar 15. PMID: 23379639; PMCID: PMC3668503.

12. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *Pediatr Dent*. 2013 Mar-Apr; 35(2):129-40. PMID: 23635981.

13. Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, Caparrós-Martín JA, Valencia M, Letón R, Martínez-Glez V, Elhossini R, Amr K, Vilaboa N, Ruiz-Perez VL. Identification of a frameshift mutation in *Osterix* in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*. 2010

Jul 9; 87(1):110-4. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.05.016. Epub 2010 Jun 24. PMID: 20579626; PMCID: PMC2896769.

14. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell*. 2007 Feb 23; 128(4):707-19. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.015. PMID: 17320508.

15. Li B, Ouchi T, Cao Y, Zhao Z, Men Y. Dental-Derived Mesenchymal Stem Cells: State of the Art. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jun 22; 9:654559. doi: 10.3389/fcell.2021.654559. PMID: 34239870; PMCID: PMC8258348.

16. Liu Z, Lee HL, Suh JS, Deng P, Lee CR, Bezouglaia O, Mirnia M, Chen V, Zhou M, Cui ZK, Kim RH, Lee M, Aghaloo T, Hong C, Wang CY. The ER α /KDM6B regulatory axis modulates osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *Bone Res*. 2022 Jan 7; 10(1):3. doi: 10.1038/s41413-021-00171-z. PMID: 34992221; PMCID: PMC8738748.

17. Meyer MB, Benkusky NA, Pike JW. The RUNX2 cistrome in osteoblasts: characterization, down-regulation following differentiation, and relationship to gene expression. *J Biol Chem*. 2014 Jun 6; 289(23):16016-31. doi: 10.1074/jbc.M114.552216. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24764292; PMCID: PMC4047377.

18. Montecino M, Carrasco ME, Nardocci G. Epigenetic Control of Osteogenic Lineage Commitment. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jan 8; 8:611197. doi: 10.3389/fcell.2020.611197. PMID: 33490076; PMCID: PMC7820369.

19. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*. 1997 May 30; 89(5):773-9. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80260-3. PMID: 9182765.

20. Rojas A, Aguilar R, Henriquez B, Lian JB, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ, van Zundert B, Allende ML, Montecino M. Epigenetic Control of the Bone-master Runx2 Gene during Osteoblast-lineage Commitment by the Histone Demethylase JARID1B/KDM5B. *J Biol Chem*. 2015 Nov 20; 290(47):28329-28342. doi: 10.1074/jbc.M115.657825. Epub 2015 Oct 9. PMID: 26453309; PMCID: PMC4653688.

21. Samsonraj RM, Dudakovic A, Manzar B, Sen B, Dietz AB, Cool SM, Rubin J, van Wijnen AJ. Osteogenic Stimulation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Using a Fungal Metabolite That Suppresses the Polycomb Group Protein EZH2. *Stem Cells Transl Med.* 2018 Feb; 7(2):197-209. doi: 10.1002/sctm.17-0086. Epub 2017 Dec 27. PMID: 29280310; PMCID: PMC5788881.

22. Tai PW, Wu H, Gordon JA, Whitfield TW, Barutcu AR, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Stein JL. Epigenetic landscape during osteoblastogenesis defines a differentiation-dependent Runx2 promoter region. *Gene.* 2014 Oct 15; 550(1):1-9. doi: 10.1016/j.gene.2014.05.044. Epub 2014 Jun 2. PMID: 24881813; PMCID: PMC4149845.

23. Voigt P, Tee WW, Reinberg D. A double take on bivalent promoters. *Genes Dev.* 2013 Jun 15; 27(12):1318-38. doi: 10.1101/gad.219626.113. PMID: 23788621; PMCID: PMC3701188.

24. Wu H, Whitfield TW, Gordon JA, Dobson JR, Tai PW, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Genomic occupancy of Runx2 with global expression profiling identifies a novel dimension to control of osteoblastogenesis. *Genome Biol.* 2014 Mar 21; 15(3):R52. doi: 10.1186/gb-2014-15-3-r52. PMID: 24655370; PMCID: PMC4056528.

25. Yang D, Yu B, Sun H, Qiu L. The Roles of Histone Demethylase Jmjd3 in Osteoblast Differentiation and Apoptosis. *J Clin Med.* 2017 Feb 23; 6(3):24. doi: 10.3390/jcm6030024. PMID: 28241471; PMCID: PMC5372993.

26. Ye L, Fan Z, Yu B, Chang J, Al Hezaimi K, Zhou X, Park NH, Wang CY. Histone demethylases KDM4B and KDM6B promotes osteogenic differentiation of human MSCs. *Cell Stem Cell.* 2012 Jul 6; 11(1):50-61. doi: 10.1016/j.stem.2012.04.009. Erratum in: *Cell Stem Cell.* 2018 Dec 6; 23(6):898-899. doi: 10.1016/j.stem.2018.11.002. PMID: 22770241; PMCID: PMC3392612.

27. Yeasmin S, Ceccarelli J, Vigen M, Carrion B, Putnam AJ, Tarle SA, Kaigler D. Stem cells derived from tooth periodontal ligament enhance functional angiogenesis by endothelial

cells. *Tissue Eng Part A*. 2014 Apr; 20(7-8):1188-96. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0512. Epub 2013 Dec 21. PMID: 24147894; PMCID: PMC3993081.

28. Yu S, Jiang Y, Galson DL, Luo M, Lai Y, Lu Y, Ouyang HJ, Zhang J, Xiao G. General transcription factor IIA-gamma increases osteoblast-specific osteocalcin gene expression via activating transcription factor 4 and runt-related transcription factor 2. *J Biol Chem*. 2008 Feb 29; 283(9):5542-53. doi: 10.1074/jbc.M705653200. Epub 2008 Jan 2. PMID: 18171674; PMCID: PMC2736298.

29. Zhou X, Zhang Z, Feng JQ, Dusevich VM, Sinha K, Zhang H, Darnay BG, de Crombrughe B. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Jul 20; 107(29):1291924. doi: 10.1073/pnas.0912855107. Epub 2010 Jul 6. PMID: 20615976; PMCID: PMC2919908.