

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DO POTENCIAL
OSTEOGÊNICO EM CÉLULAS MESENQUIMAIS
DERIVADAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL**

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

ARTHUR GEORG SCHMIDT

SÃO PAULO
2019

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DO POTENCIAL
OSTEOGÊNICO EM CÉLULAS MESENQUIMAIS
DERIVADAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL**

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

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

ARTHUR GEORG SCHMIDT

SÃO PAULO

2019

Schmidt, Arthur Georg.

Regulação epigenética do potencial osteogênico em células mesenquimais derivadas do ligamento periodontal. / Arthur Georg Schmidt. – 2019.

19 f. : il. color.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Clínica Odontológica.

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

1. Epigenética. 2. Células mesenquimais estromais. 3. Multipotencialidade. 4. RG108. 5. Dimetil sulfóxido. I. Andia, Denise Carleto (orientadora). II. Título.

ARTHUR GEORG SCHMIDT

**REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DO POTENCIAL
OSTEOGÊNICO EM CÉLULAS MESENQUIMAIS
DERIVADAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL**

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

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/____/_____
Prof.^a Dr.^a Denise Carleto Andia
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/_____
Prof.^a Dr.^a Mirlene Cecília Soares Pinho Cenarch
Universidade Metropolitana de Santos – UNIMES

_____/____/_____
Prof. Dr. Bruno Bueno Silva
Universidade Univeritas – UNG

_____/____/_____
Prof. Dr. Adriano Fonseca de Lima
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/_____
Prof. Dr. Fábio César Prosdócimi
Universidade Paulista – UNIP

EPÍGRAFE

*“O coração do homem dispõe o seu caminho,
mas é o Senhor quem dirige seus passos.”*

Provérbios 16:9

DEDICATÓRIA

A Deus.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Patrícia, meu amor e minha companheira, e aos meus filhos, Miguel e Helena, minhas joias e meus orgulhos, que me trazem inspiração e força para acordar cedo e me deitar tarde, feliz, todos os dias: vocês são a razão da minha vida! Amo vocês mais que a mim mesmo.

Aos meus pais, Ary e Gizella, que sempre me apoiaram e incentivaram e deram as condições para que um dia eu pudesse chegar aqui. Muito obrigado, amo vocês.

À Profa. Dra. Denise Carleto Andia, minha orientadora, colocada em minha jornada acadêmica pelas mãos de Deus, por quem tenho profunda admiração e respeito, muito obrigado.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho: “trabalhar em equipe é unir várias formas de pensar para um só objetivo.” (Autor desconhecido).

RESUMO

Anteriormente, nós caracterizamos células do ligamento periodontal (PDLCs) com capacidades distintas para desenvolverem fenótipos osteogênicos, apresentando alta e baixa capacidade para produzir nódulos minerais *in vitro*. Aqui, nosso objetivo foi determinar se a capacidade de PDLCs em produzir nódulos minerais mantém qualquer relação com marcas epigenéticas e alterações nos perfis de transcritos e proteínas. As PDLCs foram pré-tratadas com um modulador epigenético (RG108) por 3 dias antes da indução à diferenciação osteogênica. As células foram então coletadas após 3 dias de diferenciação osteogênica *in vitro* (osteogênese inicial) e os seguintes parâmetros foram avaliados: viabilidade celular, apoptose, capacidade de produzir nódulos minerais, (hidroxi)metilação do DNA, níveis proteicos e de transcritos de marcadores epigenéticos, de multipotencialidade e osteogênicos em ambos os fenótipos: alto (h-PDLCs) e baixo (l-PDLCs) potencial osteogênico. h-PDLCs e l-PDLCs mostraram perfis epigenéticos e transcricionais distintos em níveis basais e após osteogênese inicial ou pré-tratamentos. Após 21 dias de biomineralização, o RG108 demonstrou um aumento significativo na capacidade de produzir nódulos minerais *in vitro*, em comparação com PDLCs induzidas apenas à osteogênese. DMSO (o veículo de RG108) também induziu o fenótipo osteogênico. Além disso, o RG108 regulou positivamente as translocações de NANOG e OCT4 para o núcleo e modulou os transcritos de marcadores osteoblásticos em l-PDLCs. O *RUNX2* foi regulado epigeneticamente em resposta ao RG108, o que culminou em alterações detectáveis na sua transcrição, aumentando os níveis de proteína no interior do núcleo. Curiosamente, o DMSO também modulou o *RUNX2* e, inversamente, regulou negativamente NANOG e OCT4 para o interior do núcleo, em l-PDLCs. Por fim, foi demonstrado que a osteogênese pode ser aumentada por agentes epigenéticos em PDLCs com baixa capacidade de produzir nódulos minerais *in vitro*. Essas descobertas lançam luz ao potencial uso de abordagens epigenéticas para modular a biomineralização de maneira previsível.

Palavras-chave: Epigenética. Células mesenquimais estromais. Multipotencialidade. RG108. Dimetil sulfóxido

ABSTRACT

We have previously characterized periodontal ligament cells (PDLCs) with distinct capacities to undergo osteogenic phenotypes, presenting high and low ability to produce mineral nodules in vitro. Here, our goal was to determine whether the ability of PDLCs to produce mineral nodules holds any relation with epigenetic marks and changes on transcript and protein profiles. PDLCs were pre-treated with an epigenetic modulator (RG108) up to 3 days before inducing osteogenic differentiation. The challenged cells were then harvested after 3 days of the in vitro osteogenic differentiation (early osteogenesis) and the following parameters were assessed: cell viability, apoptosis, ability to produce mineral nodules, DNA (hydroxy)methylation, transcripts and protein levels of epigenetic, multipotentiality and osteogenic markers in both high (h-PDLCs) and low (l-PDLCs) osteogenic potential phenotypes. h-PDLCs and l-PDLCs show distinct epigenetic and transcript profiles at basal levels and after early osteogenesis or pre-treatments. After 21 days of biomineralization, RG108 showed a significant increase in the ability to produce mineral nodules in vitro, comparing to PDLCs induced to osteogenesis only. DMSO (RG108 vehicle) also promoted the osteogenic phenotype. Furthermore, RG108 upregulated NANOG and OCT4 translocations to nucleus and modulated the transcripts of osteoblastic markers in l-PDLCs. *RUNX2* was epigenetically regulated in response to RG108, which culminated with detectable changes on its transcription, increasing the protein levels into the nucleus. Interestingly, DMSO also upmodulated *RUNX2* and, conversely, downregulated NANOG and OCT4 into the nucleus, in l-PDLCs. In conclusion, it was demonstrated that osteogenesis may be increased by epigenetic agents in PDLCs with low capacity to produce mineral nodules in vitro. These findings shed light on the potential use of epigenetic approaches to predictably modulate bio-mineralization.

Key-words: Epigenomics. Mesenchymal stromal cells. Multipotency. RG108. Dimethyl sulfoxide.

LISTA DE ABREVIATURAS

5hmC	5-hidroximetilcitosina
5mC	5-metilcitosina
BMP2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
CpG	Citosina fosfato guanina
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNMTs	DNA metiltransferases
DNMT1	DNA metiltransferase do tipo 1
DNMT3A	DNA metiltransferase do tipo 3A
DNMT3B	DNA metiltransferase do tipo 3B
hBMSCs	<i>Human bone marrow stromal osteoprogenitor cells</i>
h-PDLCs	<i>High osteogenic potential phenotype</i> (células do ligamento periodontal com alto potencial osteogênico)
l-PDLCs	<i>Low osteogenic potential phenotype</i> (células do ligamento periodontal com baixo potencial osteogênico)
iPS	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
miR	Micro RNA
miR32	Micro RNA 32
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i>
NANOG	NANOG Homeobox
OCN	<i>Osteocalcin</i>
OCT4	Octâmero 4
OM	<i>Osteogenic medium</i>
OPN	<i>Osteopontin</i>
OSX	<i>Osterix</i>
PDL	<i>Periodontal ligament</i>
PDLCs	Células do ligamento periodontal
RUNX2	Fator 2 de transcrição relacionado ao runt
SSP1	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
TET	<i>Ten eleven translocation</i>

TET1	<i>Ten eleven translocation</i> do tipo 1
TET2	<i>Ten eleven translocation</i> do tipo 2
TET3	<i>Ten eleven translocation</i> do tipo 3

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	PROPOSIÇÃO.....	15
3.	CONCLUSÕES	16
3.1	Geral	16
3.2	Específicas	16
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	17
	ANEXO – Certificado do Comitê de Ética	19

1. INTRODUÇÃO

Epigenética pode ser definida como o “estudo de mudanças na função do gene que são meiótica e/ou mitoticamente herdadas, sem mudanças na sequência do DNA” ou como o “estudo das alterações na regulação de genes que não causam modificações na cadeia de DNA”. Sendo assim, o genoma pode sofrer alterações funcionais significativas sem modificar a sequência dos nucleotídeos.^{1, 2, 3}

A cromatina é constituída pela molécula de DNA e proteínas a ela associadas, denominadas histonas. Os processos de metilação e hidroximetilação do DNA são exemplos de modificações epigenéticas que levam a alterações na cromatina, mudando assim quimicamente o DNA, bem como as histonas. O resultado destas alterações termina por ativar ou desativar genes.^{3, 4}

Durante o processo de metilação do DNA, a cromatina é modificada, adicionando-se um grupo metil no carbono 5 da citosina, transformando-a em 5-metilcitosina (5mC), modificando assim a acessibilidade dos fatores de transcrição ao DNA. A metilação do DNA é catalisada por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs), sendo a DNMT do tipo 1 (DNMT1) responsável pela manutenção do padrão de metilação nas novas cópias do DNA. As DNMTs do tipo 3A e 3B (DNMT3A e DNMT3B) são relacionadas à metilação denominada *de novo*, pois adicionam um novo radical metil ao DNA. Adquirem assim um novo padrão de metilação em resposta imediata ao ambiente.^{5, 6, 7, 8}

Considerando a acessibilidade à cromatina, as enzimas da família Ten Eleven Translocation (TETs) 1, 2 e 3 cumprem outro papel importante relacionado ao DNA e às modificações epigenéticas, i.e., a hidroximetilação. Para tanto, estas enzimas oxidam a 5-metilcitosina (5mC) em 5-hidroximetilcitosina (5hmC), sendo esse o primeiro passo para a desmetilação do DNA, pois uma cromatina hidroximetilada

torna-se menos condensada, dado que possui uma arquitetura que favorece a aproximação dos fatores de transcrição e, conseqüentemente, a expressão de genes.⁹

Os processos de metilação e hidroximetilação do DNA, bem como as enzimas associadas a estes, estão diretamente ligados à remodelação da cromatina. Neste contexto, moduladores epigenéticos têm sido utilizados para manipular padrões epigenéticos experimentalmente.¹⁰

Grande parte do esforço no campo da epigenética para a descoberta de novas drogas foi feito na área do câncer, sendo grande o potencial para o desenvolvimento de agentes que modulem o epigenoma nessa área. Como exemplo, alterações epigenéticas, ao contrário das mutações genéticas, são potencialmente reversíveis e podem ser restauradas ao seu estado normal pela terapia epigenética fazendo-se uso de moduladores epigenéticos. Desse modo, este tipo de terapia torna-se promissora e relevante.^{10,11}

Um desses moduladores epigenéticos é o RG108 ou ácido propanóico 2-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2Hisoindol-2-yl)-3-(1H-indol-3-yl) ou N-Phtalil-L-triptofano. Trata-se de um composto especificamente criado para inibir a atividade das DNMTs, podendo contribuir para o processo de desmetilação do DNA ao tornar a cromatina menos condensada e acessível para a ação dos fatores de transcrição. Isto se deve ao fato de o RG108 inibir especificamente a atividade da DNMT1, bloqueando seu sítio ativo e impedindo a adição do radical metil ao carbono 5 da citosina na molécula do DNA.¹²

A população de células do ligamento periodontal (PDLs) humano é constituída por diversos tipos celulares, dentre os quais estão células progenitoras aptas a fazerem a manutenção da homeostase tecidual. Estas, mesmo quando obtidas do ligamento periodontal maduro, detêm propriedades de células-tronco similares às células-tronco mesenquimais.¹

Para tanto, PDLCs expressam genes como o fator de transcrição de ligação ao octâmero 4 (OCT4) – uma proteína também conhecida como POU5F1, domínio POU, classe 5, fator de transcrição 1 – e a proteína NANOG Homeobox – codificada pelo gene *NANOG* (*NANOG*). Ambas são proteínas do tipo homeobox, fazendo parte dos “*master control genes*”, i.e., genes controladores do desenvolvimento, por atuarem no topo de hierarquias genéticas e fazerem a regulação de aspectos essenciais da embriogênese e diferenciação celular de uma série de organismos, conferindo assim às PDLCs a capacidade de manterem-se indiferenciadas e pluripotentes.¹³

Tanto OCT4 quanto NANOG são importantes biomarcadores de células-tronco embrionárias humanas: suas expressões foram demonstradas em PDLCs humanas e ambos demonstraram estar envolvidos na inibição da diferenciação espontânea em células-tronco mesenquimais.^{14, 15}

PDLCs podem se diferenciar em células semelhantes a osteoblastos quando cultivadas em meio osteogênico *in vitro*.^{1,16} Porém, esta capacidade de diferenciação pode variar ao se considerar doadores diferentes. Isto nos permite classificar as PDLCs em células de alto e baixo potencial osteogênico, sendo que células de baixo potencial osteogênico apresentam menor habilidade de produzir nódulos minerais *in vitro* do que as células de alto potencial osteogênico. As PDLCs podem expressar genes relacionados ao fenótipo osteoblástico como o Fator 2 de Transcrição Relacionado ao Runt (*RUNX2*) e outros, nos quais Runt é um domínio proteico conservado evolutivamente. *RUNX2* é uma proteína – conhecida também como subunidade alfa-1 do fator de ligação ao núcleo (CBF- α -1)^{16,17,18} e pode ser detectado em progenitores de osteoblastos, atingindo níveis mais altos em osteoblastos imaturos e diminuindo durante a maturação destas células.^{19, 20}

Modificações no fenótipo celular requerem ativação de genes relacionados à formação óssea e inibição de marcadores gênicos relacionados a células indiferenciadas. Essas alterações podem ser controladas por mudanças epigenéticas e reguladas por meio do remodelamento da cromatina, no qual a arquitetura desta depende dos padrões de metilação do DNA: a forma ativa da cromatina é associada a um DNA desmetilado, enquanto que a forma inativa é relacionada ao DNA metilado. Estes mecanismos de remodelamento da cromatina baseiam-se na adição de radicais (como o metil, por exemplo), deixando esta mais ou menos condensada dependendo do grau de metilação/desmetilação da mesma. A ativação de genes se dá por meio da desmetilação (ou hidroximetilação), que deixa a cromatina descompactada, e a inibição de outros genes pela metilação das ilhas CpG, o que leva à condensação da cromatina e impede sua leitura pelo RNAm.^{3, 4, 5, 6}

Até o presente momento, as marcas epigenéticas relacionadas aos fenótipos osteogênicos não foram completamente elucidadas. No presente estudo, nós levamos em consideração resultados e experiências prévias com fenótipos distintos de PDLCs para poder melhor entender as marcas epigenéticas e as consequentes mudanças em um conjunto de genes envolvidos na manutenção do fenótipo osteogênico. Neste contexto, nós desenvolvemos ensaios funcionais com o modulador epigenético RG108 (um inibidor de DNMTs), como uma estratégia utilizada para melhorar os mecanismos de regeneração na terapia celular, principalmente levando em consideração o fenótipo celular com baixo potencial osteogênico.

2. PROPOSIÇÃO

No presente estudo, nós propomos modular terapêuticamente eventos moleculares nos genes *NANOG*, *OCT4* e *RUNX2*, fazendo uso do modulador epigenético RG108, com o objetivo final de aumento do potencial osteogênico em células do ligamento periodontal com baixo potencial osteogênico.

3. CONCLUSÕES

3.1 Geral

O fenótipo osteogênico das PDLCs requer um envolvimento dinâmico das marcas epigenéticas. As DNMTs destacam-se como importantes moléculas neste processo, sendo que a osteogênese pode ser aumentada por agentes epigenéticos em PDLCs com baixa capacidade de produzir nódulos minerais *in vitro*. Como essas macromoléculas podem ser alvos terapêuticos, o presente estudo abre novos caminhos para modular terapêuticamente a diferenciação osteoblástica e promover a osteogênese de maneira mais previsível.

3.2 Específicas

- a) As PDLCs com potenciais osteogênicos distintos também apresentam perfis epigenéticos e transcricionais distintos nos níveis basais e na fase inicial da osteogênese ou após os pré-tratamentos com RG108 e DMSO.
- b) O RG108 não possui efeitos citotóxicos nas PDLCs; antecipa a transcrição de biomarcadores osteogênicos; e aumenta a translocação nuclear de NANOG e OCT4, desencadeando alterações epigenéticas e transcricionais do gene *RUNX2*, aumentando a translocação nuclear de *RUNX2* e o potencial osteogênico das I-PDLCs.
- c) O DMSO não possui efeitos citotóxicos nas PDLCs; diminui a translocação nuclear de NANOG e OCT4; e regula positivamente a translocação do *RUNX2* para o núcleo, promovendo efeito osteogênico similar ao RG108, porém sem promover mudanças epigenéticas nas regiões regulatórias.
- d) Em ambos os tratamentos, a regulação positiva de *RUNX2* foi maior que em NANOG e OCT4, o que pode ter contribuído para o aumento do potencial osteogênico das I-PDLCs.
- e) RG108 e DMSO promoveram efeitos osteogênicos indutores similares no estágio final da osteogênese nas I-PDLCs.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

1. Seo JY, Park YJ, Yi YA, Hwang JY, Lee IB, Cho BH, et al. Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. *Restor Dent Endod*. 2015;40(1):14-22.
2. Komori T. Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2009;43-49.
3. Lod S, Johansson T, Abrahamsson K, Larsson L. The influence of epigenetics in relation to oral health. *International Journal of Dental Hygiene*. 2013;12(1):48-54.
4. Wu C. Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. *Science*. 2001;293(5532):1103-1105.
5. Vincent A, Van Seuningen I. Epigenetics, stem cells and epithelial cell fate. *Differentiation*. 2009 Sep-Oct;78(2-3):99-107.
6. Eslaminejad MB, Fani N, Shahhoseini M. Epigenetic regulation of osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in culture. *Cell J*. 2013;15(1):1-10.
7. Fuks F. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *The EMBO Journal*. 2001;20(10):2536-2544.
8. Turek-Plewa J, Jagodziński PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2005;10(4):631-647.
9. Tahiliani M, Koh K, Shen Y, Pastor W, Bandukwala H, Brudno Y et al. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930-935.
10. Pachaiyappan B, Woster P. Design of small molecule epigenetic modulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2014;24(1):21-32.
11. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006;5(1):37-50.
12. Brueckner B, Boy RG, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, et al. Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes by a Novel Small-Molecule Inhibitor of Human DNA Methyltransferases. *Cancer Research*. 2005;65(14):6305-6311.
13. Bürglin T, Affolter M. Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma*. 2015;125(3):497-521.
14. Kawanabe N, Murata S, Murakami K, Ishihara Y, Hayano S, Kurosaka H et al. Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. *Differentiation*. 2010;79(2):74-83.
15. Tsai C, Su P, Huang Y, Yew T, Hung S. Oct4 and Nanog Directly Regulate Dnmt1 to Maintain Self-Renewal and Undifferentiated State in Mesenchymal Stem Cells. *Molecular Cell*. 2012;47(2):169-182.
16. Gay I, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthodontics & Craniofacial Research*. 2007;10(3):149-160.

17. Rios H, Lin Z, Oh B, Park C, Giannobile W. Cell- and Gene-Based Therapeutic Strategies for Periodontal Regenerative Medicine. *Journal of Periodontology*. 2011;82(9):1223-1237.
18. Enomoto H, Shiojiri S, Hoshi K, Furuichi T, Fukuyama R, Yoshida C et al. Induction of Osteoclast Differentiation by Runx2 through Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) and Osteoprotegerin Regulation and Partial Rescue of Osteoclastogenesis in Runx2 $^{-/-}$ Mice by RANKL Transgene. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(26):23971-23977.
19. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K et al. Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Cell*. 1997;89(5):755-764.
20. Maruyama Z, Yoshida C, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R et al. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Developmental Dynamics*. 2007;236(7):1876-1890.

Anexo – Certificado do Comitê de Ética



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Regulação epigenética em células mesenquimais humanas", protocolo CAAE nº 55588816.4.0000.5418, dos pesquisadores Denise Carleto Andia, Rahyza Inacio Freire de Assis e Francesca Racca, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 02 de outubro de 2017.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School, University of Campinas, certify that the project "Epigenetic regulation in human mesenchymal stem cells", CAAE 55588816.4.0000.5418, of Denise Carleto Andia, Rahyza Inacio Freire de Assis and Francesca Racca, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on October 02, 2017.

Prof. Fernanda Miori Pascon

Vice Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Junior

Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo e a lista de autores aparece como fornecidos pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title and the list of researchers of the project appears as provided by the authors, without editing.