JENNY ANDREA ARÉVALO ROMERO

**IMPACTO DA DEPLEÇÃO DA CO-CHAPERONINA STIP1 NO CONTROLE
DA PLURIPOTÊNCIA, PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS**

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Hohmuth Lopes

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2017

RESUMO

ROMERO, J. A. A. **Impacto da depleção da co-chaperonina STIP1 no controle da pluripotência, proliferação e diferenciação de células-tronco embrionárias murinas.** 2017. 93f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Stress Inducible Phosphoprotein 1 (STIP1) é uma co-chaperonina versátil capaz de modular diversos processos biológicos. STIP1 tem sido associada ao desenvolvimento em mamíferos uma vez que camundongos nocaute para esta molécula apresentam letalidade embrionária a partir do décimo dia de vida intrauterina (E10.5). Nesse contexto, para estudar as funções reguladas por STIP1 no desenvolvimento embrionário inicial de camundongos, geramos células-tronco embrionárias murinas (CTEm) com expressão reduzida de STIP1 através de silenciamento gênico estável por shRNA e depleção da expressão pelo sistema CRISPR/Cas9. Nosso estudo mostra que a ausência de STIP1 perturba a via de sinalização JAK/STAT3, que por sua vez, resulta em níveis reduzidos de expressão dos fatores de transcrição NANOG, OCT4 e SOX2, mostrando a importância de STIP1 como molécula reguladora de *stemness*. A depleção de STIP1 diminui proliferação de CTEm, a qual foi resgatada parcialmente após tratamento com STIP1 exógena, indicando um papel na regulação da autorenovação dessas células. Além disso, STIP1 apresenta função central na diferenciação em CTEm, pois sua expressão é requerida para formação de corpos embrióides (EBs). Adicionalmente, ensaios de formação de teratoma revelam que a depleção de STIP1 afeta a formação do tumor *in vivo* e favorece a formação de tecidos da mesoderme quando foram comparadas com a diferenciação a partir de células parentais. Desse modo, nosso trabalho revela um papel essencial para STIP1 na biologia de CTEm uma vez que a perda-de-função dessa molécula afeta os processos de auto-renovação, proliferação, pluripotência e diferenciação celulares, caracterizando assim novas funções para a versátil co-chaperonina no desenvolvimento em mamíferos.

Palavras-chave: Células-tronco embrionárias murinas. STIP1. Co-chaperoninas. Pluripotência. Desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

ROMERO, J. A. A. **Impact of STIP1 cochaperone depletion on the control of pluripotency, proliferation and differentiation of murine embryonic stem cells** 2017. 93p. PhD Thesis (Cell and Tissue Biology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Stress Inducible Phosphoprotein 1 (STIP1) is a versatile cochaperone capable of modulating various biological processes. STIP1 has been associated with development in mammals since knockout mice for this molecule present lethality at embryonic day (E) 10.5. In this context, to study the functions regulated by STIP1 in early embryonic development of mice, we generated murine embryonic stem cells (CTEm) with reduced expression of STIP1 through stable gene silencing by shRNA and depletion of STIP1 expression by CRISPR-Cas9 system. Our study shows that absence of STIP1 disrupts JAK/STAT3 signaling pathway, which in turn results in reduced expression levels of NANOG, OCT4 and SOX2 transcription factors, showing the importance of STIP1 as stemness regulating molecule. Depletion of STIP1 decreases proliferation of CTEm, which was partially rescued after treatment with exogenous STIP1, indicating a role in the regulation of self-renewal of these cells. Furthermore, STIP1 has a central role in differentiation of CTEm, since its expression is required for the proper formation of embryoid bodies (EBs). In addition, teratoma formation assays reveal that STIP1 depletion affects tumor formation in vivo, favoring the formation of mesoderm tissues when compared to differentiation pattern from parental cells. Thus, our work reveals an essential role for STIP1 in the biology of CTEm, since loss-of-function of the cochaperone affect self-renewal, proliferation, pluripotency and differentiation processes. These data describe novel unrecognized functions for the versatile cochaperone in mammalian development.

Keywords: Murine embryonic stem cells. STIP1. Co-chaperones. Pluripotency. Embryonic development.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento embrionário inicial em murinos

O desenvolvimento inicial em mamíferos é um período caracterizado pelo potencial de totipotência e pluripotência das células que formam as estruturas embrionárias. Conhecido também como período de desenvolvimento pre-implantacional, o processo em murinos, começa com o ovo fertilizado totipotente o qual através de divisões celulares torna-se o blastocisto no dia embrionário (E) 4.5, representando uma estrutura com as primeiras populações celulares diferenciadas no desenvolvimento que contribuirão para a formação de tecidos extraembrionários como também do próprio embrião (FRANKENBERG et al., 2016; GRAHAM; ZERNICKA-GOETZ, 2016; NICHOLS; SMITH, 2012) (Figura 1).

Figura 1 - Desenvolvimento inicial em murinos.

O processo começa com o zigoto totipotente o qual através de clivagens completa uma estrutura com 16 células, onde as interações dos blastômeros, definem a formação da massa celular interna (MCI) e o trofoectoderma (TE). Seguidamente, as células da MCI têm um processo de especificação celular que por sua vez originam as populações do endoderme primitivo (EP) e epiblasto (EPI), que darão origem aos anexos extraembrionários como o saco vitelínico e tecidos do embrião, respectivamente. Fonte: Graham; Zernicka-Goetz, 2016.

A primeira decisão de comprometimento celular é identificada no estágio de 16-32 células, onde por processos de polarização são evidenciadas duas populações celulares: a população externa a qual origina o TE, que por sua vez originará a placenta. Por outro lado, as células localizadas no interior formarão a MCI do blastocisto inicial. Interessantemente, a população celular presente na MCI apresenta um processo de especificação celular adicional, (BESSONNARD et al., 2014; CHAZAUD et al., 2006) que leva a formação de dois grupos celulares: Precusores do EP ou endoderme primitivo, responsáveis por formar anexos extraembrionários, e os precusores do EPI, uma população celular capaz de dar origem aos três folhetos embrionários: ectoderme, mesoderme e endoderme. Embora o mecanismo de segregação das duas populações não esteja completamente esclarecido, conhece-se que o

EPI é regulado por uma rede onde a expressão do fator de transcrição (FT) NANOG em colaboração com outros fatores como OCT4 e SOX2, regulam a expressão de Fator de Crescimento de Fibroblasto-4 (FGF4) que por sua vez é capaz de inibir a expressão do fator de crescimento GATA6. Já no processo de especificação celular do EP, modelos matemáticos sugerem que o FGF4 secretado pelas células do EPI ativa os receptores de FGF presentes nas células do EP, permitindo assim a ativação da via de sinalização *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase* (MAPK/ERK) através de mecanismos dependentes de fosforilação que ativam a expressão de GATA6, inibindo a expressão de NANOG (Figura 2) (CHAZAUD; YAMANAKA, 2016).

Figura 2 - Mecanismo de especificação celular do EPI e EP no desenvolvimento inicial.

A população de células do EPI (painel esquerdo) expressa os fatores de pluripotência NANOG, OCT4 e SOX2 que por sua vez ativam a expressão de FGF4, inibindo a expressão de GATA6. Por outro lado, as células do EP realizam sua especificação com o FGF4 secretado pelas células do EPI, o qual se liga nos receptores de FGF presentes na superfície celular, permitindo assim a ativação da via MAPK/ERK que induzem a expressão de GATA6, inibindo a expressão de NANOG. Fonte: Chazaud; Yamanaka, 2016.

A população celular do EPI pré-implantação apresenta importância especial devido ao seu potencial de desenvolver todas as células somáticas do embrião, e quando derivadas e mantidas em cultura, tornam-se as células-tronco embrionárias murinas (CTEm) (NICHOLS; SMITH, 2009).

1.2 Células-tronco embrionárias

As CTE_m foram reportadas na literatura pela primeira vez a partir da MCI de blastocistos murinos (EVANS; KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). Estudos recentes demonstram que o perfil transcricional e funcional das CTE_m tem semelhança com o EPI pré-implantação, tendo a propriedade de desenvolver todas as linhagens de células somáticas e germinativas a qual é chamada de pluripotência *naïve* (BOROVIK; NICHOLS, 2014; NICHOLS; SMITH, 2009). Adicionalmente este estado celular é caracterizado por possuir seu genoma hipometilado (LEITCH et al., 2013) assim como a expressão de uma rede de fatores de transcrição gênica específica (DE LOS ANGELES et al., 2015). Também possui capacidade de autorenovação ilimitada em condições de cultura celular específicas (BOROVIK; NICHOLS, 2014). Adicionalmente em murinos destaca-se a capacidade de CTE_m para a contribuição na formação de quimeras quando são introduzidas em blastocistos hospedeiros (GARDNER; ROSSANT, 1979).

As CTE_m podem ser cultivadas com dos sistemas que mantêm seu *status* de pluripotência. O primeiro deles é o sistema *standard*, o qual é realizado na presença de soro fetal bovino (SFB) junto com a citocina fator Inibitório de Leucemia (LIF) (SMITH et al., 1988), sendo capaz de promover a auto-renovação ilimitada das células através da ativação da via de sinalização *Janus kinase/Signal transducer and activation of transcription 3* (JAK/STAT3). Alternativamente, as CTE_m podem ser cultivadas na presença de dois inibidores farmacológicos chamados de *cocktail 2i*, os quais bloqueiam a sinalização da via *Mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal regulated kinase* (MEK/ERK) assim como da via *Glycogen synthase kinase 3* (GSK3), promovendo assim um sistema de pluripotência chamado *ground state*, o qual considera condições livres de restrições epigenéticas assim como requerimentos mínimos de estímulos extrínsecos contemplados no sistema *standard* (WRAY; KALKAN; SMITH, 2010). Desse modo, a ação do *cocktail 2i* promove a estabilidade na pluripotência a qual é refletida na presença de colônias homogêneas de CTE_m em cultura. (TEN BERGE et al., 2011; WELLING; GEIJSEN, 2013; YING et al., 2008).

Dentro dos atores responsáveis pela expressão do *status* pluripotente das CTEM, tem sido caracterizada uma rede de FT composta por OCT4, SOX2 e NANOG os quais são capazes de formar um robusto circuitor regulador.

OCT4 é distinguido pela expressão constante durante a formação e maturação do EPI. Também, sabe-se que OCT4 é expresso desde o ovócito, porém torna-se restrito na MCI a partir do E3.5, sendo essencial na geração das células da MCI, já que embriões com deficiência no gene *Pou5f1* que codifica para OCT4, geram células da MCI com marcadores de trofoectoderme (NICHOLS et al., 1998; RALSTON et al., 2010). SOX2 é o parceiro melhor caracterizado de OCT4, sendo marcado o complexo formado por eles dois como os grandes reguladores da rede (GUO et al., 2010). SOX2 faz parte da família de fatores de transcrição SOX e sua expressão é restrita nas células da MCI desde o estágio de blastocisto inicial (GUO et al., 2010).

Por outro lado, NANOG é uma proteína *homeobox* essencial para o desenvolvimento de mamíferos, já que sua deleção provoca letalidade embrionária. Sua expressão é necessária para a especificação da MCI no embrião pré-implantação, e apresenta função antagônica com o FT GATA6, requerido na regulação da especificação do EP (TORRES-PADILLA; CHAMBERS, 2014). NANOG possui um padrão de expressão diferente aos outros dos FT componentes da rede *core* de pluripotência, uma vez que diversos estudos têm caracterizado uma expressão heterogênea por parte de NANOG em CTEM em cultura o qual é capaz de gerar subpopulações com alta ou baixa expressão do fator de transcrição (CHAMBERS et al., 2007; FILIPCZYK et al., 2015; MIYANARI; TORRES-PADILLA, 2012). Esta flutuação nos níveis de expressão de NANOG é intrínseco ao processo de pluripotência já que foi demonstrado que tanto as CTEM cultivadas em condições *standard* (SFB + LIF) assim como no sistema de *ground-state* (presença de *2i*) possuem este padrão de expressão (ABRANCHES et al., 2014).

Desse modo, os três fatores (OCT4, SOX2 E NANOG) são assim considerados grandes reguladores, orquestrando autorrenovação e pluripotência nas CTEM (SHI; JIN, 2010; THOMSON et al., 2011).

1.3 Corpos embrióides

Os corpos embrióides (EBs) são agregados tridimensionais de CTEM que são capazes de recapitular eventos iniciais da diferenciação *in vivo* (LI; YURCHENCO, 2006). Morfologicamente, caracterizam-se como agregados celulares esféricos com a propriedade de polarização celular que mimetizam eventos peri-implantação. O método de predileção para realizar sua geração é através da técnica *Hanging Drop*, na qual são agrupadas 3000-5000 células em gotículas de meio de cultura sem adição de LIF, que vão permitir seu crescimento em suspensão, podendo ser caracterizados por metodologias como microscopia convencional ou cortes histológicos. Devido ao seu alto nível de organização, o desenvolvimento de EBs tem sido bem caracterizado. O primeiro evento que acontece é a formação do agregado tridimensional no qual as células não possuem polaridade (1º dia). Em seguida, as células que se encontram na periferia do EBs, começam a adquirir um comprometimento, mimetizando a formação do EP (2º dia). Após formação do EP, ocorre a formação da membrana basal (MB) cuja função além de fornecer os nutrientes para manutenção, é delimitar espacialmente a formação de diferentes tecidos dentro do EB. A MB atua como uma barreira na qual, as células que estão presentes na face externa tem comprometimento celular a EP assim como a endoderme visceral enquanto as células que ficam em seu interior adquirem especificidade para formação do epiblasto (4º-5º dia). No entanto, só as células que ficam em contato direto com a MB continuam viáveis, enquanto as células distantes entram em apoptose, gerando assim uma cavidade central dentro do EB (5º-6º dia) (LI; YURCHENCO, 2006) (Figura 3).

Figura 3 - Eventos envolvidos no desenvolvimento de EBs *in vitro*.

A ilustração mostra os eventos do desenvolvimento recapitulados por parte dos EBs, onde a formação da membrana basal é essencial para gerar processos de especificação tecidual, gerando assim as populações da endoderme e epiblasto. Fonte Li; Yurchenco, 2006.

1.4 Stress Inducible Phosphoprotein 1

A proteína *Stress Inducible Phosphoprotein 1* (STIP1) ou também chamada *Heat Shock Organizing Protein* (HOP) é uma proteína que inicialmente foi descoberta em leveduras (NICOLET; CRAIG, 1989), sendo muito conservada entre espécies, com homólogos em murinos, humanos, plantas e parasitas (HONORE et al., 1992; JOHNSON; BROWN, 2009; LÄSSLE et al., 1997; MORALES et al., 2010; ODUNUGA; LONGSHAW; BLATCH, 2004)

A primeira função descrita para STIP1 foi sua ação como co-chaperonina, permitindo e regulando a formação do complexo entre as chaperonas Hsp70 e Hsp90 no processo de homeostase protéica (FLOM et al., 2007; KUNDRAT; REGAN, 2010; LEE et al., 2012; LI; SOROKA; BUCHNER, 2012; MCCLELLAN; FRYDMAN, 2001; VAN DER SPUIY et al., 2001) (Figura 4). As chaperonas moleculares fazem parte de uma família de proteínas adaptadas para facilitar o enovelamento de outras proteínas (KREGEL, 2002). As proteínas de choque térmico (HSP) pertencem à superfamília de chaperonas que são nomeadas de acordo com suas massas moleculares em kiloDaltons (kDa) e são produzidas em altas quantidades pela maioria das células como resposta ao estresse, exercendo funções cito-protetoras (MACARIO; CONWAY DE MACARIO, 2007).

Figura 4 – Modelo esquemático da conformação do complexo Hsp70/STIP1/Hsp90

STIP1 é uma molécula com um comportamento dinâmico que através do seu módulo flexível permite formar o complexo proteico com as proteínas Hsp70 e Hsp90. Fonte: Schmid et al., 2012.

O genoma murino possui uma cópia do gene de STIP1 no cromossomo 19 o qual contém 14 exons que codificam para a proteína STIP1 (YI; DOUDEVSKI; REGAN, 2010), a qual possui uma sequência de 543 aminoácidos (ONUOHA et al., 2008) com um massa molecular aproximada de 66 kDa (ZANATA et al., 2002). A estrutura proteica da STIP1 apresenta três domínios tetratricopeptídeos nomeados TPR1, TPR2A e TPR2B) os quais permitem a interação com Hsp70 (via TPR1 e TPR2B) e Hsp90 (via TPR2A e TPR2B). Também contém dois domínios DP ricos em aspartato e prolina (DP1 e DP2) que ainda não possuem função caracterizada (ODUNUGA; LONGSHAW; BLATCH, 2004; ONUOHA et al., 2008; RÖHL et al., 2015; SCHMID et al., 2012) (Figura 5).

Figura 5 - Desenho esquemático da estrutura da proteína STIP1/Hop.

A proteína consiste em três domínios TPR (TPR1, TPR2A e TPR2B) e dois domínios ricos em aspartato e prolina (DP1 e DP2). Fonte: Röhl et al., 2015.

STIP1 é uma proteína versátil quem tem sido encontrada em diferentes localizações celulares. O citosol tem sido caracterizado o compartimento onde circula preferencialmente em forma livre ou em associação com o complexo formado junto com Hsp70/Hsp90 (ODUNUGA; LONGSHAW; BLATCH, 2004; ROMANO et al., 2009; SANTOS TG et al., 2011). No entanto,

também tem sido encontrada no espaço extracelular (ARANTES et al., 2009; DA FONSECA et al., 2012), superfície celular (BERALDO et al., 2010; CHIARINI et al., 2002; ZANATA et al., 2002) assim como no núcleo (DANIEL et al., 2009; ODUNUGA; LONGSHAW; BLATCH, 2004).

Adicionalmente, STIP1 pode ser secretada por diferentes tipos celulares como astrócitos (ARANTES et al., 2009; HAJJ et al., 2013; SOARES et al., 2013), microglia (DA FONSECA et al., 2012), células de glioblastoma (IGLESIA et al., 2017), células-tronco neurais (SANTOS et al., 2011), e CTE_m (CRUZ et al., 2017).

STIP1 é capaz de interagir com outras proteínas, podendo formar um complexo junto com a proteína prion (PrP^C), para participar em eventos biológicos como neuritogênese e neuroproteção (LOPES et al., 2005) através da atividade de receptores de acetilcolina $\alpha 7$ nicotínicos (BERALDO et al., 2010), desenvolvimento de astrócitos (ARANTES et al., 2009; HARTMANN; MARTINS; LIMA, 2013), formação de memória de curto prazo e consolidação de memória de longo prazo (COITINHO et al., 2007; HAJJ et al., 2013; LOPES; SANTOS, 2012). Dados recentes demonstram que STIP1, além de regular processos envolvidos na plasticidade neural no tecido nervoso desde o desenvolvimento até vida adulta, também é capaz de modular a biologia de grupos celulares menos diferenciados como células-tronco. Em células-tronco neurais, STIP1 modula a autorrenovação e proliferação celular atuando de forma conjunta com PrP^C (SANTOS et al., 2011).

Evidências apontam a participação de STIP1 assim como da proteína Hsp90 na modulação de eventos biológicos associados as CTE_m. Estudos mostraram a participação de STIP1 na manutenção de pluripotência uma vez que sua presença facilita a fosforilação e translocação nuclear do *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) (LONGSHAW et al., 2009; SETATI et al., 2010). De modo similar, foi reportada como Hsp90 é capaz de modular a expressão de STAT3 assim como dos FT OCT4 e NANOG, junto com os quais estabelece associações que os protegem de degradação via proteassomo (BRADLEY et al., 2012). Por outro lado, a ausência de *STIP1* foi associada a malformações na formação de EBs (LONGSHAW et al., 2009; PRINSLOO et al., 2009).

1.5 Papel de STIP1 no desenvolvimento

Estudos realizados em nematódeos, usando *C. elegans* como modelo, reportaram que mutantes para *C. elegans STI-1* (CeSTI-1, proteína homóloga de STIP1) apresentaram diminuição da taxa de fertilidade e uma alta letalidade que levou a um menor tempo de vida, sugerindo um papel homeostático em situações de estresse e regulação de longevidade em nematódeos (SONG et al., 2009).

Recentemente, *HOP* tem sido associada a processos de desenvolvimento em ovários de *Drosophila*. Fêmeas com a expressão reduzida de *STIP1* por RNA de interferência são capazes de colocar ovos na mesma taxa que as fêmeas *wild-type*, no entanto os ovos gerados não têm capacidade de eclodir em larvas (KARAM et al., 2017).

Em mamíferos, foi identificada a expressão de STIP1 em ovócitos murinos fazendo parte de um grupo de proteínas que são reguladas negativamente durante a maturação de ovócitos, sugerindo para STIP1 um papel regulador nos processos de meiose em ovócitos em desenvolvimento (VITALE et al., 2007). STIP1 é detectada desde estágios iniciais (dia embrionário - E8.0) do desenvolvimento de murinos, incrementando sua expressão até o E10, onde é encontrada principalmente no sistema nervoso com uma expressão dorsoventral, sendo expressa de forma constitutiva desde o E12 até a idade adulta (HAJJ et al., 2009).

Recentemente, as funções de STIP1 na biologia do desenvolvimento começaram a ser esclarecidas, uma vez que camundongos deficientes para STIP1 (STIP1^{-/-}) sobrevivem apenas até o décimo dia de vida embrionária, apresentando deficiências na formação do tubo neural e no broto de membros (BERALDO et al., 2013). No mesmo estudo, foi demonstrado como a ausência de STIP1 no desenvolvimento não interfere nos níveis de expressão de Hsp90, mas afeta, de modo direto, a expressão das proteínas clientes de Hsp90 como *G-protein-receptor kinase 2* (GRK2), *STAT3* e *p53*, que diminuem sua expressão até 50% nos embriões STIP1^{-/-}. Interessantemente, também foi reportado um aumento do número células em apoptose nos animais STIP1^{-/-}, as quais mostraram uma ativação aumentada da Caspase 3 ativada, sugerindo um papel regulador de estresse celular para STIP1 como já foi reportado anteriormente. Diante deste cenário, além da regulação de processos que governam o desenvolvimento tardio, sugere-se a participação de STIP1 no período de pré-implantação, já

que a frequência mendeliana dos animais nocaute apresentada no E3.5 é significativamente baixa (13%). Esses resultados ressaltam a capacidade de STIP1 modular a sobrevivência celular no desenvolvimento embrionário, do mesmo modo como já foi caracterizado em outros grupos celulares como neurônios (ARANTES et al., 2009; LOPES et al., 2005).

Diante dos achados apresentados anteriormente, este trabalho pretende caracterizar as funções exercidas por STIP1 na biologia do desenvolvimento, usando como modelo CTEm expressando diferentes níveis de STIP1; caracterizando sua expressão com os genes reguladores de pluripotência: NANOG, OCT4 e SOX2, estabelecendo também a participação de STIP1 em fenômenos de pluripotência, sobrevivência, proliferação e diferenciação celular.

1.6 Justificativa

As CTEm são uma ferramenta de abordagem *in vitro* que mimetizam o desenvolvimento embrionário inicial, sendo amplamente utilizadas como modelo de estudo na biologia do desenvolvimento devido a suas propriedades de autorenovação e pluripotência. Também são consideradas um bom modelo para estudar mecanismos hierárquicos de diferenciação e comprometimento celular.

Os fatores de transcrição que constituem o circuito de controle de manutenção de pluripotência tem sido caracterizados amplamente, porém os processos envolvidos na transição/saída do estado pluripotente para processos primários de comprometimento celular está começando a ser elucidado através de perfis de expressão gênica global nas células, encontrando assim novos atores dentro do circuito (SMITH, 2017).

As HSPs tem sido objeto de estudo na biologia de células-tronco, incluindo as CTEm, já que possuem altos níveis de expressão de chaperonas e co-chaperonas para manter uma homeostase celular frente aos agentes causadores de estresse celular (FAN, 2012). Interessantemente, as HSPs parecem ter um papel essencial no desenvolvimento embrionário, uma vez que a falta de expressão de algumas delas, como o caso da chaperona Hsp90 (VOSS; THOMAS; GRUSS, 2000) e das co-chaperoninas Mrj (WATSON et al., 2007) e p23 (GRAD et al., 2006), provoca letalidade embrionária iminente. Surpreendentemente, a co-chaperonina STIP1 também demonstrou ser essencial no desenvolvimento em murinos, já que em sua ausência diminui a expressão das proteínas clientes de HSP90, ativa a expressão de Caspase-

3 e afeta a proliferação celular levando a letalidade embrionária no E10.5 (BERALDO et al., 2013).

Diante desses fatos, a caracterização do papel de STIP1 no desenvolvimento embrionário em mamíferos torna-se relevante para elucidar sua função nos mecanismos de pluripotência, sobrevivência, proliferação e diferenciação celulares tendo como modelo de estudo as CTEs, o que pode acarretar em sua potencial aplicação na medicina regenerativa.

6. CONCLUSÕES

- Depleção de STIP1 prejudica a proliferação celular em CTEM.
- A ausência de STIP1 em CTEM promove uma diferenciação celular espontânea em cultura.
- STIP1 regula a pluripotência de CTEM via JAK/STAT3, uma vez que a expressão dos fatores de transcrição NANOG, SOX2 e OCT4 estão negativamente regulados nessas células (Figura 30).
- STIP1 altera aspectos morfológicos durante formação de EBs, uma vez que sua ausência promove a formação de endoderme mais evidente e malformações na geração de cavidades.
- Perda-de-expressão de STIP1 prejudica a formação de teratoma e favorece a diferenciação em tecido da mesoderme *in vivo*.

Figura 6 – Esquema representativo do papel exercido por STIP1 na regulação da pluripotência de CTEM. Os nossos resultados postulam a co-chaperonina STIP1 como um importante regulador da pluripotência em CTEM via JAK/STAT3, modulando assim a expressão dos fatores de transcrição SOX2, OCT4 e NANOG de forma isolada ou junto com Hsp90.

REFERÊNCIAS*

- ABRANCHES, E.; GUEDES, A. M. V.; MORAVEC, M.; MAAMAR, H.; SVOBODA, P.; RAJ, A.; HENRIQUE, D. Stochastic NANOG fluctuations allow mouse embryonic stem cells to explore pluripotency. **Development**, v. 141, n. 14, p. 2770–2779, 2014.
- ARANTES, C.; NOMIZO, R.; LOPES, M. H.; HAJJ, G. N. M.; LIMA, F. R. S.; MARTINS, V. R. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. **Glia**, v. 57, n. 13, p. 1439–1449, 2009.
- BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D. A.; HORVATH, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, n. March, p. 1709–1712, 2007.
- BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 234–244, 2014.
- BERALDO, F. H. et al. Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. **FASEB Journal**, v. 27, n. 9, p. 3594–3607, 2013.
- BERALDO, F. H.; ARANTES, C. P.; SANTOS, T. G.; QUEIROZ, N. G. T.; YOUNG, K.; RYLETT, R. J.; MARKUS, R. P.; PRADO, M. A. M.; MARTINS, V. R. Role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 47, p. 36542–36550, 2010.
- BESSONNARD, S.; DE MOT, L.; GONZE, D.; BARRIOL, M.; DENNIS, C.; GOLDBETER, A.; DUPONT, G.; CHAZAUD, C. Gata6, Nanog and Erk signaling control cell fate in the inner cell mass through a tristable regulatory network. **Development**, v. 141, n. 19, p. 3637–3648, 2014.
- BOROVIAK, T.; NICHOLS, J. The birth of embryonic pluripotency. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 369, n. 1657, p. 20130541, 2014.
- BRADLEY, E.; BIEBERICH, E.; MIVECHI, N. F.; TANGPISUTHIPONGSA, D.; WANG, G. Regulation of embryonic stem cell pluripotency by heat shock protein 90. **Stem Cells**, v. 30, n. 8, p. 1624–1633, 2012.
- CHAMBERS, I.; SILVA, J.; COLBY, D.; NICHOLS, J.; NIJMEIJER, B.; ROBERTSON, M.; VRANA, J.; JONES, K.; GROTEWOLD, L.; SMITH, A. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. **Nature**, v. 450, n. 7173, p. 1230–1234, 2007.
- CHAZAUD, C.; YAMANAKA, Y. Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. **Development (Cambridge, England)**, v. 143, n. 7, p. 1063–74, 2016.
- CHAZAUD, C.; YAMANAKA, Y.; PAWSON, T.; ROSSANT, J. Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. **Developmental Cell**, v. 10, n. 5, p. 615–624, 2006.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHIARINI, L. B.; FREITAS, A. R. O.; ZANATA, S. M.; BRENTANI, R. R.; MARTINS, V. R.; LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO Journal**, v. 21, n. 13, p. 3317–3326, 2002.

COITINHO, A. S.; LOPES, M. H.; HAJJ, G. N. M.; ROSSATO, J. I.; FREITAS, A. R.; CASTRO, C. C.; CAMMAROTA, M.; BRENTANI, R. R.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V. R. Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. **Neurobiology of Disease**, v. 26, n. 1, p. 282–290, 2007.

CONG, L.; RAN, F.; COX, D.; LIN, D.; BARRETTO, R.; MARRAFFINI, L.; ZHANG, F. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, v. 339, n. March, p. 819–824, 2013.

CRUZ, L.; AREVALO ROMERO, J. A.; BRANDÃO PRADO, M.; SANTOS, T. G.; HOHMUTH LOPES, M. Evidence of Extracellular Vesicles Biogenesis and Release in Mouse Embryonic Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 2017.

DA FONSECA, A. C. C.; ROMÃO, L.; AMARAL, R. F.; ASSAD KAHN, S.; LOBO, D.; MARTINS, S.; MARCONDES DE SOUZA, J.; MOURA-NETO, V.; LIMA, F. R. S. Microglial stress inducible protein 1 promotes proliferation and migration in human glioblastoma cells. **Neuroscience**, v. 200, p. 130–141, 2012.

DANIEL, S.; LONGSHAW, V. M.; BRADLEY, G.; SÖTI, C.; CSERMELY, P.; BLATCH, G. L.; BAXTER, M.; PREWITZ, M.; BLATCH, G. L.; ROMANO, S. A.; CORDEIRO, Y.; LIMA, L. M.; LOPES, M. H.; SILVA, J. L.; FOGUEL, D.; LINDEN, R. Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock, and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding. **European Journal of Cell Biology**, v. 1783, n. 3, p. 4308–4316, 2009.

DE LOS ANGELES, A.; FERRARI, F.; XI, R.; FUJIWARA, Y.; BENVENISTY, N.; DENG, H.; HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R.; LEE, S.; LEITCH, H. G.; LENSCH, M. W.; LUJAN, E.; PEI, D.; ROSSANT, J.; WERNIG, M.; PARK, P. J.; DALEY, G. Q. Hallmarks of pluripotency. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. 469–78, 2015.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096–1258096, 2014.

ETOC, F.; METZGER, J.; RUZO, A.; KIRST, C.; YONEY, A.; OZAI, M. Z.; BRIVANLOU, A. H.; SIGGIA, E. D. A Balance between Secreted Inhibitors and Edge Sensing Controls Gastruloid Self-Organization. **Developmental Cell**, v. 39, n. 3, p. 302–315, 2016.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, 1981.

FAN, G.-C. **Role of heat shock proteins in stem cell behavior**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. v. 111

FILIPCZYK, A.; MARR, C.; HASTREITER, S.; FEIGELMAN, J.; SCHWARZFISCHER, M.; HOPPE, P. S.; LOEFFLER, D.; KOKKALIARIS, K. D.; ENDELE, M.; SCHAUBERGER, B.; HILSENBECK, O.; SKYLAKI, S.; HASENAUER, J.; ANASTASSIADIS, K.; THEIS, F. J.; SCHROEDER, T. Network plasticity of pluripotency transcription factors in embryonic stem cells. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 10, p. 1235–1246, 2015.

FLOM, G.; BEHAL, R. H.; ROSEN, L.; COLE, D. G.; JOHNSON, J. L. Definition of the minimal fragments of Sti1 required for dimerization, interaction with Hsp70 and Hsp90 and in vivo functions. **The Biochemical journal**, v. 404, n. 1, p. 159–67, 2007.

FRANKENBERG, S. R.; DE BARROS, F. R. O.; ROSSANT, J.; RENFREE, M. B. The mammalian blastocyst. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 5, n. 2, p. 210–232, 2016.

GARDNER, R. L.; ROSSANT, J. Investigation of the fate of 4-5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 52, p. 141–152, 1979.

GRAD, I.; MCKEE, T. A.; LUDWIG, S. M.; HOYLE, G. W.; RUIZ, P.; WURST, W.; FLOSS, T.; MILLER, C. A.; PICARD, D. The Hsp90 cochaperone p23 is essential for perinatal survival. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 23, p. 8976–83, 2006.

GRAHAM, S. J. L.; ZERNICKA-GOETZ, M. The Acquisition of Cell Fate in Mouse Development: How Do Cells First Become Heterogeneous? **Current Topics in Developmental Biology Inc.**, 2016. v. 117

GUO, G.; HUSS, M.; TONG, G. Q.; WANG, C.; LI SUN, L.; CLARKE, N. D.; ROBSON, P. Resolution of Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst. **Developmental Cell**, v. 18, n. 4, p. 675–685, 2010.

HAJJ, G. N. M.; ARANTES, C. P.; DIAS, M. V. S.; ROFF??, M.; COSTA-SILVA, B.; LOPES, M. H.; PORTO-CARREIRO, I.; RABACHINI, T.; LIMA, F. R.; BERALDO, F. H.; PRADO, M. M. A.; LINDEN, R.; MARTINS, V. R. The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 17, p. 3211–3227, 2013.

HAJJ, G. N. M.; SANTOS, T. G.; COOK, Z. S. P.; MARTINS, V. R. Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. **Journal of Comparative Neurology**, v. 517, n. 3, p. 371–384, 2009.

HARTMANN, C. A.; MARTINS, V. R.; LIMA, F. R. S. High levels of Cellular Prion Protein improve astrocyte development. **FEBS Letters**, v. 587, n. 2, p. 238–244, 2013.

HONORE, B.; LEFFERSSFL, H.; RASMUSSEN, H. H.; VANDEKERCKHOVE, J.; CELISG, J. E. Human Protein Containing the TPR Motif and Sharing Identity to the. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 12, p. 8485–8491, 1992.

IGLESIA, R. P.; PRADO, M. B.; CRUZ, L.; MARTINS, V. R.; SANTOS, T. G.; LOPES, M. H. Engagement of cellular prion protein with the co-chaperone Hsp70/90 organizing protein regulates the proliferation of glioblastoma stem-like cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 76, 2017.

JOHNSON, J. L.; BROWN, C. Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. **Cell Stress and Chaperones**, v. 14, n. 1, p. 83–94, 2009.

KARAM, J. A.; PARIKH, R. Y.; NAYAK, D.; ROSENKRANZ, D.; GANGARAJU, V. K.; WEK, R. C. Co-chaperone Hsp70/Hsp90-organizing protein (Hop) is required for transposon silencing and Piwi-interacting RNA (piRNA) biogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 15, p. 6039–6046, 2017.

KREGEL, K. C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 92, n. 5, p. 2177–2186, 2002.

KUNDRAT, L.; REGAN, L. Balance between folding and degradation for Hsp90-dependent client proteins: A key role for CHIP. **Biochemistry**, v. 49, n. 35, p. 7428–7438, 2010.

LACKIE, R. E.; MACIEJEWSKI, A.; OSTAPCHENKO, V. G.; MARQUES-LOPES, J.; CHOY, W. Y.; DUENNWALD, M. L.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A. M. The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. MAY, p. 1–23, 2017.

LÄSSLE, M.; BLATCH, G. L.; TAKATORI, T.; ZETTER, B. R.; LA, M.; BLATCH, G. L.; KUNDRA, V.; TAKATORI, T.; ZETTER, B. R. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different. **Cell Biology and Metabolism** v.272, n. 3, p. 1876–1884, 1997.

LEE, C.-T.; GRAF, C.; MAYER, F. J.; RICHTER, S. M.; MAYER, M. P. Dynamics of the regulation of Hsp90 by the co-chaperone Sti1. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 6, p. 1518–1528, 2012.

LEE, H. J.; GUTIERREZ-GARCIA, R.; VILCHEZ, D. Embryonic stem cells: a novel paradigm to study proteostasis? **The FEBS Journal**, v. 284, n. 3, p. 391–398, 2017.

LEITCH, H. G.; MCEWEN, K. R.; TURP, A.; ENCHEVA, V.; CARROLL, T.; GRABOLE, N.; MANSFIELD, W.; NASHUN, B.; KNEZOVICH, J. G.; SMITH, A.; SURANI, M. A.; HAJKOVA, P. Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 3, p. 311–6, 2013.

LI, J.; SOROKA, J.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 3, p. 624–635, 2012.

LI, S.; YURCHENCO, P. D. Matrix assembly, cell polarization, and cell survival: analysis of peri-implantation development with cultured embryonic stem cells. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 329, n. 3, p. 113–25, 2006.

LONGSHAW, V. M.; BAXTER, M.; PREWITZ, M.; BLATCH, G. L. Knockdown of the co-chaperone Hop promotes extranuclear accumulation of Stat3 in mouse embryonic stem cells. **European Journal of Cell Biology**, v. 88, n. 3, p. 153–166, 2009.

LOPES, M. H.; HAJJ, G. N. M.; MURAS, A. G.; MANCINI, G. L.; CASTRO, R. M. P. S.; RIBEIRO, K. C. B.; BRENTANI, R. R.; LINDEN, R.; MARTINS, V. R. Interaction of Cellular Prion and Stress-Inducible Protein 1 Promotes Neuritogenesis and Neuroprotection by Distinct Signaling Pathways. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 49, p. 11330–11339, 2005.

LOPES, M. H.; SANTOS, T. G. Prion potency in stem cells biology. **Prion**, v. 6, n. 2, p. 142–146, 2012.

MACARIO, A. J. L.; CONWAY DE MACARIO, E. Chaperonopathies and chaperonotherapy. **FEBS Letters**, v. 581, n. 19, p. 3681–3688, 2007.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 12, p. 7634–7638, 1981.

MCCLELLAN, A. J.; FRYDMAN, J. Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. **Nature cell biology**, v. 3, n. February, p. E51–E53, 2001.

MIYANARI, Y.; TORRES-PADILLA, M.-E. Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog. **Nature**, v. 483, n. 7390, p. 470–473, 2012.

MORALES, M. A.; WATANABE, R.; DACHER, M.; CHAFEY, P.; OSORIO Y FORTÉA, J.; SCOTT, D. A.; BEVERLEY, S. M.; OMMEN, G.; CLOS, J.; HEM, S.; LENORMAND, P.; ROUSSELLE, J.-C.; NAMANE, A.; SPÄTH, G. F. Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the Leishmania donovani infectious stage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 18, p. 8381–8386, 2010.

NICHOLS, J.; SMITH, A. Naive and Primed Pluripotent States. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 6, p. 487–492, 2009.

NICHOLS, J.; SMITH, A. Pluripotency in the Embryo and in Culture Pluripotency in the Embryo and in Culture. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, p. 1–15, 2012.

NICHOLS, J.; ZEVIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHOLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95, p. 379–391, 1998.

NICOLET, C. M.; CRAIG, E. A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from Saccharomyces cerevisiae. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 9, p. 3638–46, 1989.

ODUNUGA, O. O.; LONGSHAW, V. M.; BLATCH, G. L. Hop: More than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. **BioEssays**, v. 26, n. 10, p. 1058–1068, 2004.

ONUOHA, S. C.; COULSTOCK, E. T.; GROSSMANN, J. G.; JACKSON, S. E. Structural Studies on the Co-chaperone Hop and Its Complexes with Hsp90. **Journal of Molecular Biology**, v. 379, n. 4, p. 732–744, 2008.

PRINSLOO, E.; SETATI, M. M.; LONGSHAW, V. M.; BLATCH, G. L. Chaperoning stem cells: A role for heat shock proteins in the modulation of stem cell self-renewal and differentiation? **BioEssays**, v. 31, n. 4, p. 370–377, 2009.

RALSTON, A.; COX, B. J.; NISHIOKA, N.; SASAKI, H.; CHEA, E.; RUGG-GUNN, P.; GUO, G.; ROBSON, P.; DRAPER, J. S.; ROSSANT, J. Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. **Development**, v. 137, n. 3, p. 395–403, 2010.

RÖHL, A.; WENGLER, D.; MADL, T.; LAGLEDER, S.; TIPPEL, F.; HERRMANN, M.; HENDRIX, J.; RICHTER, K.; HACK, G.; SCHMID, A. B.; KESSLER, H.; LAMB, D. C.; BUCHNER, J. Hsp90 regulates the dynamics of its cochaperone Sti1 and the transfer of Hsp70 between modules. **Nature Communications**, v. 6, p. 6655, 2015.

ROMANO, S. A.; CORDEIRO, Y.; LIMA, L. M.; LOPES, M. H.; SILVA, J. L.; FOGUEL, D.; LINDEN, R. Reciprocal remodeling upon binding of the prion protein to its signaling partner hop/STI1. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 12, p. 4308–4316, 2009.

SANTOS, T. G.; BERALDO, F. H.; HAJJ, G. N. M.; LOPES, M. H.; ROFFE, M.; LUPINACCI, F. C. S.; OSTAPCHENKO, V. G.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A. M.; MARTINS, V. R. Laminin- γ 1 chain and stress inducible protein 1 synergistically mediate PrPC-dependent axonal growth via Ca^{2+} mobilization in dorsal root ganglia neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 124, n. 2, p. 210–223, 2013.

SANTOS TG; SILVA IG; B, C.-S.; LEPIQUE AP; VR, M.; MH, L. Enhanced Neural Progenitor/Stem Cells Self-Renewal via the Interaction of Stress-Inducible Protein 1 with the Prion Protein. **Stem Cells**, v. 31, n. 10, p. 2136–48, 2011.

SCHMID, A. B. et al. The architecture of functional modules in the Hsp90 co-chaperone Sti1/Hop. **The EMBO journal**, v. 31, n. 6, p. 1506–17, 2012.

SETATI, M. M.; PRINSLOO, E.; LONGSHAW, V. M.; MURRAY, P. A.; EDGAR, D. H.; BLATCH, G. L. Leukemia inhibitory factor promotes Hsp90 association with STAT3 in mouse embryonic stem cells. **IUBMB Life**, v. 62, n. 1, p. 61–66, 2010.

SHI, G.; JIN, Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. **Stem cell research & therapy**, v. 1, n. 5, p. 39, 2010.

SMITH, A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. **Development**, v. In Press, p. 365–373, 2017.

SMITH, A G.; HEATH, J. K.; DONALDSON, D. D.; WONG, G. G.; MOREAU, J.; STAHL, M.; ROGERS, D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. **Nature**, v. 336, n. 6200, p. 688–690, 1988.

SOARES, I. N. et al. Regulation of stress-inducible phosphoprotein 1 nuclear retention by protein inhibitor of activated STAT PIAS1. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 12, p. 3253–70, 2013.

SONG, H. O.; LEE, W.; AN, K.; LEE, H. SUK; CHO, J. H.; PARK, Z. Y.; AHNN, J. C. elegans STI-1, the Homolog of Sti1/Hop, Is Involved in Aging and Stress Response. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, n. 4, p. 604–617, 2009.

ŠTEFKOVÁ, K.; PROCHÁZKOVÁ, J.; PACHERNÍK, J. Alkaline phosphatase in stem cells. **Stem Cells International**, v. 2015, n. 2006, 2015.

TEN BERGE, D.; KUREK, D.; BLAUWKAMP, T.; KOOLE, W.; MAAS, A.; EROGLU, E.; SIU, R. K.; NUSSE, R. Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. **Nature cell biology**, v. 13, n. 9, p. 1070–5, 2011.

THOMSON, M.; LIU, S. J.; ZOU, L. N.; SMITH, Z.; MEISSNER, A.; RAMANATHAN, S. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. **Cell**, v. 145, n. 6, p. 875–889, 2011.

TORRES-PADILLA, M.-E. E.; CHAMBERS, I. Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage. **Development (Cambridge, England)**, v. 141 VN-, n. 11, p. 2173–2181, 2014.

VAN DER SPUIY, J.; CHEETHAM, M. E.; DIRR, H. W.; BLATCH, G. L. The cochaperone murine stress-inducible protein 1: overexpression, purification, and characterization. **Protein expression and purification**, v. 21, p. 462–469, 2001.

- VITALE, A.; KENNEDY, M.; MALLAVARAPU, M.; YURTAS, P.; PERLIN, J.; HERR, J.; COONROD, S. Proteomic Profiling of Murine Oocyte Maturation. **MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT**, v. 74, n. 1, p. 608–616, 2007.
- VOSS, A. K.; THOMAS, T.; GRUSS, P. Mice lacking HSP90 β fail to develop a placental labyrinth. **Development**, v. 127, n. 1, p. 1–11, 2000.
- WATSON, E.; GEARY-JOO, C.; HUGHES, M.; CROSS, J. The Mrj co-chaperone mediates keratin turnover and prevents the formation of toxic inclusion bodies in trophoblast cells of the placenta. **Development**, v. 134, n. 9, p. 1809–1817, 2007.
- WELLING, M.; GEIJSEN, N. Uncovering the true identity of naive pluripotent stem cells. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 9, p. 442–448, 2013.
- WRAY, J.; KALKAN, T.; SMITH, A. G. The ground state of pluripotency. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, n. 4, p. 1027–1032, 2010.
- YI, F.; DOUDEVSKI, I.; REGAN, L. HOP is a monomer: Investigation of the oligomeric state of the co-chaperone HOP. **Protein Science**, v. 19, n. 1, p. 19–25, 2010.
- YING, Q. L.; WRAY, J.; NICHOLS, J.; BATLLE-MORERA, L.; DOBLE, B.; WOODGETT, J.; COHEN, P.; SMITH, A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. **Nature**, v. 453, n. 7194, p. 519–523, 2008.
- ZANATA, S. M.; LOPES, M. H.; MERCADANTE, A. F.; HAJJ, G. N. M.; CHIARINI, L. B.; NOMIZO, R.; FREITAS, A. R. O.; CABRAL, A. L. B.; LEE, K. S.; JULIANO, M. A.; DE OLIVEIRA, E.; JACHIERI, S. G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R. R.; MARTINS, V. R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO Journal**, v. 21, n. 13, p. 3307–3316, 2002.