

SEL FEEDER DAN CONDITIONED MEDIUM UNTUK KULTUR SEL PUNCA EMBRIONIK MENCIT SEBAGAI MODEL UNTUK PROPAGASI SEL PUNCA EMBRIONIK

Aroem Naroeni^{1,2}

¹Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Cipto Mangunkusumo National Hospital

²Program Studi Bioteknologi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul
aroem@esaunggul.ac.id

Abstract

Stem cell is very promising for regenerative medicine. Unfortunately, the sources of stem cells are limited. Umbilical cord, bone marrow are now the most used as stem cell source. Many techniques are now being developed to isolate, propagate and differentiate stem cells. The development of induced-pluripotent stem cells that reprogram adult cells to stem cells are being developed as well. In this research we have developed stem cell culture for the propagation of stem cells by using feeder cells and conditioned medium. Stem cells were isolated from mice embryonic 13 days after copulation. We obtained bulks of stem cells surrounded with mouse fibroblast cells. Stem cells require this mouse fibroblast cells as a feeder and conditioned medium, Medium that have been added with supernatant of 3 days cell culture.

Keywords : *stem cell, conditioned medium, induced-pluripotent stem cell*

Abstrak

Sel punca sangat menjanjikan dalam bidang kedokteran regeneratif karena dapat menyembuhkan berbagai penyakit karena kerusakan jaringan. Meskipun begitu, sumber sel punca yang dapat digunakan untuk keperluan tersebut sangat terbatas. Sel darah pusat dan sumsum tulang belakang saat ini adalah merupakan sumber sel punca yang paling banyak digunakan. Beberapa macam teknik sedang dikembangkan untuk mengisolasi, propagasi dan differensiasi sel punca. Perkembangan induced-pluripotent stem cell (iPS) untuk propagasi sel punca juga sedang dikembangkan. Pada penelitian ini, kami mengembangkan kultur sel untuk propagasi sel punca dengan menggunakan sel *feeders* dan *conditioned medium*. Sel punca diisolasi dari embrio mencit 13 hari setelah kopulasi. Setelah dikultur dalam media tersebut maka diperoleh sekelompok sel punca yang dikelilingi oleh sel fibroblas. Sel punca dapat dikembangkan dan dipertahankan sifat kepuncaannya dengan menggunakan sel fibroblas sebagai sel *feeder* dan penambahan *conditioned medium* pada media kulturnya.

Kata kunci : *sel punca, conditioned medium, induced-pluripotent stem cell*

Pendahuluan

Sel punca sangat potensial dalam bidang kedokteran regeneratif. Sel ini menunjukkan kemampuan untuk memperbaiki jaringan yang rusak dan menyembuhkan penyakit yang berhubungan dengan kerusakan jaringan (Mason, *et al.*, 2008). Banyak aplikasi dikembangkan berdasarkan sel punca ini, beberapa diantaranya adalah :

1. Sel punca embrionik untuk luka tulang belakang, untuk penyakit hati, untuk penyakit jantung, diabetes dan osteoarthritis (Salguero-Aranda, 2016 ; Carpentier, 2016 ; Shroff, *et al.*, 2015; Vedantham, 2015 ; Fernandes, *et al.*, 2015; Avoir, 2015; Tolosa, 2015; Bruin, 2015 ; Cheng *et al.*, 2014 ; Shiba, *et al.*, 2012)
2. Sel punca progenitor yang spesifik pada jaringan tertentu untuk penyakit mata, retinopathy dan gagal fungsi jantung (Nagata, *et al.*, 2016 ; Ye *et al.*, 2016 ; Bruin, 2015; Cronk *et al.*, 2015 ; Mead *et al.*, 2015 ; Chen. *et al.*, 2014 ; Greggio *et al.*, 2013)
3. Sel punca *mesenchymal* untuk *bladder deformities*, masalah gigi, degenerasi tulang dan degenerasi otot (Potdar, *et al.*, 2015; Oshima, *et al.*, 2015 ; Sen, *et al.*, 2015; Brown, *et al.*, 2012; Levit, *et al.*, 2012 Sharma, *et al.*, 2011; Ribitsch, *et al.*, 2010 ; Csaki, *et al.*, 2007 ; Dominici *et al.*, 2006)
4. Sel punca tali pusat untuk gangguan jantung bawaan, diabetes, neurogeneratif, jaringan ikat, luka tendon dan lymphoma hodgkin (Wagner,

et al., 2016 ; Fan, et al., 2016 ; Ehrhat, et al., 2016; Benavides, et al., 2015; Leferink, et al., 2015 ; Escolar, et al., 2015 ; Park, et al., 2015 ; Ha, et al., 2015 ; Liu, et al., 2014 ; Hu, et al., 2013 ; Garzonk, et al., 2012 ; Wolfrum, et al., 2010 ; Jurga, et al., 2009)

Masalah yang ada adalah sumber sel punca baik yang pluripoten (embrionik) atau sel punca yang multipoten (adult stem cell). Sel punca pluripoten mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi 3 germayer : Ectoderm, Mesoderm dan Endoderm. Ectoderm adalah lapisan yang berkembang dan menghasilkan otak, tulang belakang, sel saraf, rambut, kulit, gigi, sel sensor mata, telinga, hidung, mulut dan sel pigmen. Mesoderm adalah lapisan yang berkembang dan menghasilkan otot, darah, pembuluh darah, jaringan ikat dan hati. Endoderm adalah jaringan yang dapat berkembang dan menghasilkan pankreas, perut, paru-paru, bladders dan sel tunas (telur atau sperma) (40).

Berbagai macam metode dikembangkan untuk propagasi sel punca dan isolasi beberapa diantaranya adalah: penggunaan fibroblas sel mencit sebagai sel *feeders*, penggunaan matrijel atau laminin, penggunaan serum pengganti FBS (Foetal Bovine Serum) dan penggunaan Fibroblast Growth Factor (FGF) (Ulloa-Montoya, et al., 2006).

Masalah etik adalah masalah utama dalam penggunaan sel puncak embrionik manusia. Oleh karena itu sel punca embrionik pada mencit dijadikan suatu model penelitian. Penelitian ini bertujuan untuk isolasi dan propagasi sel punca mencit yang bertujuan untuk menyediakan sumber sel punca.

Metode Penelitian

Isolasi Sel

Isolasi Suspensi Sel Tunggal dan Kultur Sel

Sel diperoleh dari embrio mencit setelah 13 hari kopulasi. Embrio diambil dari bagian uterus mencit. Satu mencit menghasilkan beberapa embrio. Pertama-tama kepala dari embrio dipotong dan dibuang. Badan embrio kemudian dipotong-potong dengan gunting lalu dicacah sampai halus dengan menggunakan pisau bedah steril. Proses pencacahan dilakukan di dalam media DMEM (GIBCO, Invitrogen, USA). Semua proses dilakukan dalam kondisi steril. Untuk mendapatkan suspensi sel tunggal, potongan-potongan jaringan hasil pencacahan dipisahkan secara enzimatis dengan menggunakan ultrapure Collagenase IV (GIBCO, Invitrogen, USA) dalam media DMEM (200-250

unit Collagenase per ml). Setelah diinkubasi 2,5 – 3 jam dalam suhu 37°C, spesimen diisolasi dengan pipet serologi 10 ml. Setelah inkubasi, sel disaring dengan menggunakan nylon mesh 40 um dan dicuci dua kali dengan menggunakan HBSS (Hank's Balanced Salt Medium)/2% Foetal Calf Serum diikuti dengan pencucian dua kali dengan HBSS (Gibco, Invitrogen, USA). Suspensi sel tunggal yang diperoleh kemudian dikultur dalam media DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 37°C, 5% CO₂.

Kultur Sel Punca

Suspensi sel tunggal ditanam dalam media DMEM, HEPES, L-Glutamine, ditambah dengan 1% Penicilline Streptomycine (GIBCO, Invitrogen, USA) dan ditanam dalam *plate* 24-wells *low attachment*. Media kultur sel diganti setiap 2 minggu dengan berbagai kondisi.

Sel feeder dan conditioned medium

Fibroblast embrio mencit (Mouse Embryonic Fibroblast/MEF) digunakan sebagai lapisan *feeder* untuk kultur sel punca. Sel ini menyediakan suatu bentuk kompleks dengan campuran nutrisi dan substrat yang belum diketahui komposisinya. Komplek ini digunakan untuk pertumbuhan jangka panjang dan proliferasi dari sel punca yang tidak terdiferensiasi. Sel *feeders* dan *conditioned medium* disiapkan seperti yang dijelaskan dalam *Conner et al., 2001*. Sel *feeder* dan *conditioned medium* kemudian digunakan untuk kultur dari sel punca embrionik.

Hasil dan Pembahasan

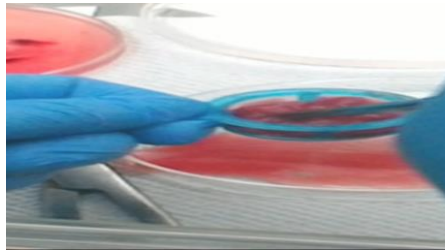
Tiga belas hari setelah kopulasi, mencit diidentifikasi kehamilannya dengan melihat ada tidaknya vaginal plug. Apabila sudah ada vaginal plug dan kehamilan pada mencit maka dilakukan pembedahan (Gambar 1). Pembedahan dilakukan dalam kondisi steril di dalam Biological Safety Cabinet (BSC)



Gambar 1

Pembedahan pada mencit yang sudah menunjukkan kehamilan 13 hari setelah kopulasi

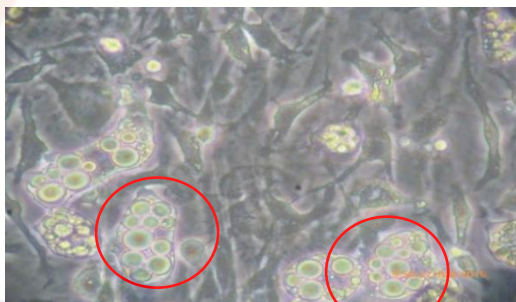
Pembedahan dilakukan dari pertengahan perut ke atas dan ke bawah. Setelah lapisan luar dibuka, kemudian dilakukan pembukaan pada lapisan sebelah dalam dengan hati-hati dengan cara menggunting pelan-pelan jaringan ikat yang ada. Setelah perut terbuka maka mulai dilakukan identifikasi uterus. Uterus mudah diidentifikasi saat terjadi kehamilan karena akan membesar dan seperti rantai yang berisi embrio-embrio. Uterus diangkat dan dipisahkan dari tubuh mencit. Uterus dibuka satu persatu untuk mengambil embrio-embrio di dalamnya. Kepala embrio dipotong dan dipisahkan dari badannya. Badan embrio kemudian dipotong kecil-kecil dan dicacah. Hasil cacahan kemudian dilewatkan ke nylon mesh 40 um, dibilas berkali-kali sampai habis sel di dalam jaringannya (Gambar 2)



Gambar 2

Isolasi suspensi sel tunggal dengan melewati pada saringan nylon mesh 40um

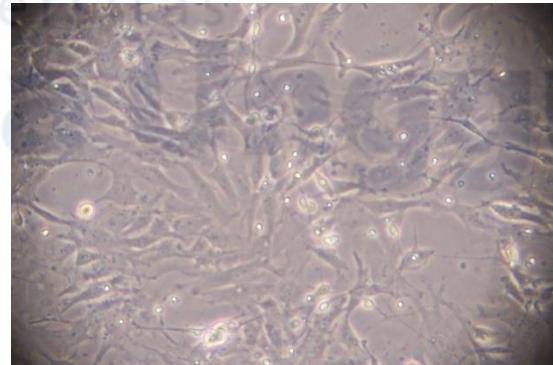
Isolasi suspensi sel tunggal kemudian dicuci dan dikultur dalam media DMEM (Gambar 3). Kultur tidak boleh terlalu lama karena apabila terlalu lama dan kehabisan sel fibroblas maka sel punca yang ada di dalamnya akan kehilangan kepuncaannya. Sel ini kemudian dapat disimpan setelah terlihat adanya sel punca dan sel fibroblas. Sel punca dan sel fibroblas disimpan secara terpisah untuk digunakan dalam eksperimen selanjutnya. Sel disimpan dalam *cryomedium* dan dimasukkan dalam tangki nitrogen cair.



Gambar 3

Kultur sel hasil isolasi suspensi sel tunggal. Perbesaran 400x digital zooming 2x

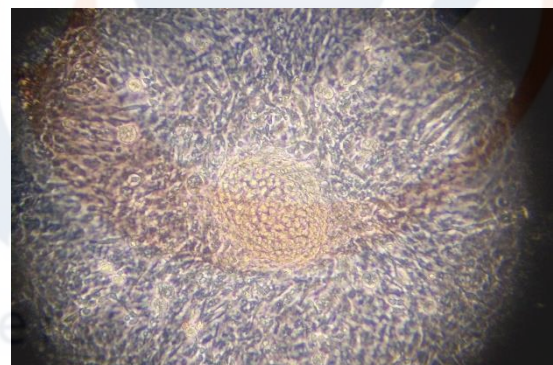
Sel hasil isolasi dari embrio terdiri dari dua macam sel secara morfologis yang dapat dibedakan yaitu sel fibroblas dan sel punca. Sel punca mempunyai morfologi yang memanjang dan menempel pada wadah kultur sel. Sel ini hanya dapat dipanen dengan menggunakan Trypsin EDTA 0.025% (Gambar 4) Sedangkan sel punca mempunyai bentuk lebih membulat dan bergerombol. Sel ini setengah menempel pada wadahnya dan tidak memerlukan Trypsin EDTA untuk memanennya.



Gambar 4

Kultur sel fibroblas yang diperoleh dari embrio mencit. Perbesaran 400x

Sel punca yang dikultur sendirian tanpa menggunakan sel feeder akan terdiferensiasi dan berubah morfologinya menjadi sel fibroblas. Sel yang mempunyai bentuk seperti ini sudah kehilangan pluripotensinya atau sifat kepuncaannya. Dengan menanamnya diatas lapisan sel fibroblas mencit, sel punca akan tetap bertahan dalam bentuk morfologi sel punca (Gambar 5). Sifat kepuncaannya dapat dibuktikan lebih lanjut dengan melihat ekspresi gen pluripotensi seperti oct4, Sox2, Lin, Klf dan lain-lain.



Gambar 5.

Kultur sel punca (a) embrio mencit dengan menggunakan feeder sel fibroblas (b) dan conditioned medium (Perbesaran 400x)

a

Model sel punca embrionik dapat diperoleh dari embrio mencit. Model ini dapat digunakan untuk berbagai model eksperimen : karakterisasi sel punca, pengembangan sel punca dengan mempertahankan sifat kepuncaannya, identifikasi marker sel punca dan gen yang mempengaruhinya, sumber sel punca untuk dideferensiasi menjadi berbagai macam sel turunannya. Pada eksperimen ini, kami menggunakan sel fibroblas yang diperoleh dari hasil isolasi suspensi sel tunggal embrio mencit. Hasil isolasi suspensi sel tunggal embrio mencit ada dua macam kelompok besar menurut morfologinya yaitu sel punca dan sel fibroblas. Kedua macam sel ini disimpan secara terpisah. Tidak seperti sel punca yang akan terdiferensiasi apabila dikultur dalam media DMEM, sel fibroblas akan dapat berkembang biak dengan cepat dan diperbanyak untuk mendapatkan stock yang diinginkan. Sel fibroblas dapat bertahan dalam beberapa kali pasasi dan bertambah banyak. Sel fibroblas ini dapat digunakan untuk berbagai macam eksperimen (Llames *et al.*, 2015).

Dalam penelitian ini kami menggunaannya sebagai lapisan sel feeder untuk kultur sel punca agar sel punca dapat dipertahankan sifat kepuncaannya. Dalam penelitian kami kultur sel punca akan dapat dipertahankan lebih baik sifat kepuncaannya apabila ditambahkan *conditioned medium* yaitu medium yang diperoleh dari kultur pertama kali pada saat kultur sel hasil isolasi suspensi sel tunggal. Media ini disimpan dan dibekukan pada suhu -30°C sampai -80°C untuk digunakan sebagai suplemen media kultur sel punca selanjutnya. *Conditioned medium* dipercaya mengandung banyak growth medium yang belum diketahui komposisinya sehingga saat ini media buatan belum dapat mempertahankan sifat kepuncaan sel punca (Pawitan *et al.*, 2014; Zhou, *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2010). Oleh karena itu, penggunaan *conditioned medium* merupakan cara sederhana untuk dapat mempertahankan sifat kepuncaan sel punca agar dapat dikembangkan sebagai sumber sel punca untuk digunakan untuk berbagai tujuan penelitian.

Kesimpulan

Sel punca embrionik dapat diisolasi dari embrio mencit. Sel punca ini dapat dikembangkan dengan mempertahankan sifat kepuncaannya dengan menggunakan sel fibroblas sebagai sel *feeder* dan menambahkan suplemen *conditioned medium* pada media kulturnya.

Daftar Pustaka

- Avior, Y. G. Levy, M. Zimerman et al., (2015). *Microbial-derived lithocholic Acid and Vitamin K drive the Metabolic Maturation of Pluripotent Stem Cells-derived and Fetal Hepatocytes*, *Hepatology*, 62 (1) : 265–278.
- Benavides OM, A. R. Brooks, S. K. Cho, J. Petsche Connell, R. Ruano, and J. G. Jacot. (2015). *In Situ Vascularization of Injectable Fibrin/Poly (Ethylene Glycol) Hydrogels by Human Amniotic Fluid Derived Stem Cells*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103 (8): 2645–2653.
- Brown SG, R. J. Harman, and L. L. Black, (2012). *Adipose-derived stem Cell Therapy for Severe Muscle Tears in Working German Shepherds: Two Case Reports*, *Stem Cell Discovery*, 2 (2) : 41–44.
- Bruin, JE. N. Saber, N. Braun et al., (2015). *Treating Diet-induced Diabetes and Obesity with Human Embryonic Stem Cell-derived Pancreatic Progenitor Cells and Antidiabetic Drugs*, *Stem Cell Reports*, 4 (4) : 605–620.
- Carpentier, A. I. Nimgaonkar, V. Chu, Y. Xia, Z. Hu, and T. J. Liang, (2016). *Hepatic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Miniaturized Format Suitable for High-throughput Screen*, *Stem Cell Research*, 16 (3) : 640–650.
- Chen L, F. Qin, M. Ge, Q. Shu, and J. Xu. (2014). *Application of Adipose-derived Stem Cells in Heart Disease*, *Journal of Cardio-vascular Translational Research*, 7 (7) : 651–663.
- Cheng, A. Z. Kapacee, J. Peng et al., (2014). *Cartilage Repair using Human Embryonic Stem Cell-derived Chondroprogenitors*, *Stem Cells Translational Medicine*, 3 (11) : 1287–1295.
- Conner et al , (2001). *Mouse Embryo Fibroblast (Mef) Feeder Cell Preparation*, Chapter 23, Unit 23, 2.
- Cronk, SM. M. R. Kelly-Goss, H. C. Ray et al., (2015). *Adipose-derived stem Cells from Diabetic Mice Show Impaired Vascular Stabilization in a Murine Model of Diabetic Retinopathy*, *Stem Cells Translational Medicine*, 4 (5) : 459–467.

- Csaki C, U. Matis, A. Mobasheri, H. Ye, and M. Shakibaei. (2007). *Chondrogenesis, Osteogenesis and Adipogenesis of Canine Mesenchymal Stem Cells: a Biochemical, Morphological and Ultra Structural Study*," *Histochemistry and Cell Biology*, 128 (6) : 507–520.
- Dominici M, K. Le Blanc, I. Mueller et al., (2006). *Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells*. The International Society for Cellular Therapy Position Statement, *Cytotherapy* 8 (4) : 315–317.
- Ehrhart J, D. Darlington, N. Kuzmin-Nichols et al. (2016). *Biodistribution of Infused Human Umbilical Cord Blood Cells in Alzheimer's Disease-like Murine Model*, *Cell Transplantation*, 25 (1) : 195–199.
- Escobar ML, M. D. Poe, J. M. Provenzale et al. (2015). *Transplantation of Umbilical-cord Blood in Babies with Infantile Krabbe's Disease*, *The New England Journal of Medicine*, 352 (20) 2069–2081.
- Fan YP, C. Hsia, K. Tseng et al. (2016). *The Therapeutic Potential of Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly in the Treatment of Rat Peritoneal Dialysis-Induced Fibrosis*," *Stem Cells Translational Medicine*, 5 (2) : 235–247.
- Fernandes, S J. J. H. Chong, S. L. Paige et al.. (2015). *Comparison of Human Embryonic Stem Cell-derived Cardiomyocytes, Cardiovascular progenitors, and Bone Marrow Mononuclear Cells For cardiac Repair*, *Stem Cell Reports*, 5(5) : 753–762.
- Garzon, I. B. Perez-Kohler, J. Garrido-Gomez et al. (2012). *Evaluation of the Cell Viability of Human Wharton's Jelly Stem Cells for Use in Cell Therapy*, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18 (6) : 408–419.
- Greggio, C. F. De Franceschi, Figueiredo-Larsen et al. (2013). *Artificial Three-dimensional Niches Deconstruct Pancreas Development In Vitro*," *Development*, 140 (21) : 4452–4462.
- Ha CW, Y.-B. Park, J.-Y. Chung, and Y.-G. Park, (2015) *Cartilage Repair using Composites of Human Umbilical Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronic Acid Hydrogel in a Minipig Model*," *Stem Cells Translational Medicine*, 4 (9) : 1044–1051.
- Hu, X. Yu, Z. Wang et al., (2013). *Long Term Effects of the Implantation of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells from the Umbilical Cord for Newly-onset Type 1 Diabetes Mellitus*, *Endocrine Journal*, 60 (3) : 347–357.
- Jurga M, A. W. Lipkowski, B. Lukomska et al., (2009). *Generation of Functional Neural Artificial Tissue from Human Umbilical Cord Blood Stem Cells*," *Tissue Engineering Part C: Methods*, 15 (3) : 365–372.
- Leferink, AM, Y.C. Chng, C.A. van Blitterswijk, and L. Moroni. (2015). *Distribution and Viability of Fetal and Adult Human Bone Marrow Stromal Cells in a Biaxial Rotating Vessel Bioreactor after Seeding on Polymeric 3d additive Manufactured Scaffolds*," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, article 169.
- Levit, RD, N. Landazuri, E.A. Phelps et al., (2012) *Cellular Encapsulation Enhances Cardiac Repair*," *Journal of the American Heart Association*, 2 (5), Article ID e000367.
- Liu X, P. Zheng, X. Wang et al. (2014), *a Preliminary Evaluation of Efficacy and Safety of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus*, *Stem Cell Research & Therapy*, 5 (2).
- Llames S, Perez EG, Meana I, Larcher F and del Rio M. *Tissue Engineering* 21:40, pp 345-353.
- Mason, C and P. Dunnill, (2008). *A Brief Definition of Regenerative Medicine*. *Regenerative Medicine*, 3(1) : 1–5.
- Mead, B., M. Berry, A. Logan, R.A.H. Scott, W. Leadbeater and B.A. Scheven. (2015). *Stem Cell Treatment of Degenerative Eye Disease*, *Stem Cell Research*, 14 (3) : 243–257.
- Nagata, H. M. Ii, E. Kohbayashi, M. Hoshiga, T. Hanafusa, and M. Asahi. (2016). *Cardiac Adipose-derived Stem Cells Exhibit High Differentiation Potential to Cardiovascular*

- Cells In *c57bl/6 Mice*,” Stem Cells Translational Medicine, 5 (2) : 141–151.
- Oshima M and T. Tsuji, (2015) *Whole Tooth Regeneration as a Future Dental Treatment*,” Advances in Experimental Medicine and Biology, 881 : 255–269.
- Park, BS, W. S. Kim, J. S. Choi et al. (2010) *Hair Growth Stimulated by Conditioned Medium of Adipose-derived Stem Cells is Enhanced by Hypoxia: Evidence of Increased Growth Factor Secretion*. Biomedical Research, 31(1) : 27–34.
- Park, GY, D. R. Kwon, and S. C. Lee, (2015). *Regeneration of Full-thickness Rotator Cuff Tendon Tear after Ultrasound-guided Injection with Umbilical Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Model*, Stem Cells Translational Medicine, 4 (11) : 1344–1351.
- Pawitan, JA. (2014). *Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine*. Biomed Research International, 1-15.
- Potdar PD and Y. D. Jethmalani, (2015). *Human Dental Pulp Stem Cells: Applications in Future Regenerative Medicine*, World Journal of Stem Cells, 7 (5) 839–851.
- Ribitsch I, J. Burk, U. Delling et al., (2010). *Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine*, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 123 : 219–263.
- Salguero-Aranda, C. R. Tapia-Limonchi, and G. M. Cahuana. (2016). *Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells towards Functional Pancreatic Beta-cell Surrogates through Epigenetic Regulation of Pdx1 by Nitric Oxide*, Cell Transplantation.
- Sen B, Z. Xie, G. Uzer et al., (2015). *Intranuclear Actin Regulates Osteogenesis*, Stem Cells, 33 (10) : 3065–3076.
- Sharma AK, M. I. Bury, A. J. Marks et al. (2011). *a Non Human Primate Model for Urinary Bladder Regeneration using Autologous Sources of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells*,” STEM CELLS, 29 (2) : 241–250.
- Shiba, Y. S. Fernandes, W.-Z. Zhu et al., (2012). *Human ES-cell-derived Cardiomyocytes Electrically Couple and Suppress Arrhythmias In injured Hearts*, Nature, 489 (7415) : 322–325.
- Shroff, G and R. Gupta. (2015). *Human Embryonic Stem Cells in the Treatment of Patients with Spinal Cord Injury*, Annals of Neurosciences, 22(4) : 208–216.
- Tolosa, J. Caron, Z. Hannoun et al. (2015). *Transplantation of Hesc-derived Hepatocytes Protects Mice from Liver Injury*, Stem Cell Research & Therapy, 6, article 246.
- Ulloa-Montoya, F., Verfaille, C.M., dan Hu, W-S. (2005). *Culture Systems for Pluripotent Stem Cells*. Journal of Bioscience and Bioengineering 100 (1): 12-27.
- Vedantham, (2015). *New approaches to Biological Pacemakers: Links to Sinoatrial Node Development*, Trends in Molecular Medicine, 21 (12) : 749–761.
- Wagner JE Jr., C. G. Brunstein, A. E. Boitano et al. (2016). *Phase I/II Trial of Stemregenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-alone Graft*, Cell Stem Cell, 18 (1) : 144–155.
- Wolfrum K., Y. Wang, A. Prigione, K. Sperling, H. Lehrach, and J. Adjaye. (2010). *The Large Principle of Cellular Reprogramming: Lost, Acquired and Retained Gene Expression in Foreskin and Amniotic Fluid-derived Human Ips Cells*, PLoS ONE, 5 (10), Article ID e13703.
- Ye, L. M. A. Robertson, T. L. Mastracci, and R. M. Anderson. (2016). *an Insulin Signaling Feedback Loop Regulates Pancreas Progenitor Cell Differentiation during Islet Development and Regeneration*, Developmental Biology, 409 (2) : 354–369.
- Zhou BR, Y. Xu, S. L. Guo et al. (2013). *Effect of Conditioned Media of Adipose-derived Stem Cells on Wound Healing after Ablative Fractional Carbon Dioxide Laser Resurfacing*. BioMed Research International.