

Imam Rosadi, Karina, Komang A. Wahyuningsih, Iis Rosliana, Tias Widyastuti, Siti Sobariah, Irsyah Afini. (2020). Perbandingan Kemampuan Migrasi *Adipose-Derived Stem Cells* Asal Manusia pada Berbagai Medium Pertumbuhan. *Journal Bioeksperimen*. Vol. 6 (1) Pp. 45-51. Doi: 10.23917/bioeksperimen.v6i1.2795

PERBANDINGAN KEMAMPUAN MIGRASI *ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS* ASAL MANUSIA PADA BERBAGAI MEDIUM PERTUMBUHAN

Imam Rosadi^{1*}, Karina^{1,2,3}, Komang A. Wahyuningsih^{1,2,4}, Iis Rosliana¹, Tias Widyastuti¹, Siti Sobariah¹, Irsyah Afini¹

¹Hayandra Lab, Yayasan Hayandra Peduli;

²Klinik Hayandra, Yayasan Hayandra Peduli;

³Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia;

⁴Histologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya,

*E-mail korespondensi: imam.rosadi@hayandra.com

Paper submit : 11 Juli 2019, Paper publish : Maret 2020

Abstract - Cell migration is natural process that plays an important role in development of organisms. Stem cells are an important in the cells migration process due to repairing tissues or organs. Stem cells ability studies towards cell migration process have been developed and studied. In this study, adipose-derived stem cells (ADSCs) were used as cell models of stem cell migration which cultured on medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), a combination of 1 0% FBS and L-ascorbic acid (LAA), 10% human platelet-rich plasma (PRP) and 0.1% FBS as a control. The technique that used to analyse cell migration process is scratch assay method. The results of this study indicate that ADSCs were able to migrate on medium containing 10% FBS, 10% FBS-LAA and PRP. On 24 h of observation, the scratched area of ADSCs were 0.70x (control), 0.13x (10% FBS), 0.04x (10% FBS-LAA), and 0.21x (10% PRP) compared to 0 h (1.00x). The width of scratches area in the control group at 24 h was significantly higher than the other treatment groups. This is suggested due to the lack of growth factor contained in the medium as a nutrition for the cells. Therefore, it can be concluded that ADSCs are able to migrate on various medium supplemented by FBS or human PRP.

Keywords: ADSCs, Migration, FBS, LAA, PRP

Pendahuluan

Sel punca merupakan sel yang tidak atau belum terspesialisasi yang mampu berdiferensiasi menjadi sel lain dan meregenerasi dirinya sendiri (Nicoletti *et al.* 2015). Sel punca berasal dari jaringan dewasa memiliki sifat multipotensi / unipotensi yaitu mampu berdiferensiasi menjadi tiga atau satu jenis sel saja (Robertson, 2010; Kern dkk., 2006). Pada saat embriogenesis, sel punca akan membelah dan bermigrasi pada darah yang cukup jauh untuk kemudian menetap pada lokasi baru dan spesifik (Li & Bhatia, 2011). Migrasi sel punca ini penting tidak hanya pada masa embrionik tetapi juga dalam mempertahankan homeostasis maupun perbaikan jaringan dewasa (Montell *et al.* 2011).

Sifat sel punca dalam menjaga keseimbangan antara memperbaharui diri (*self-renewal*) dan berdiferensiasi menyebabkan sel punca sering kali harus berpindah ke lokasi spesifik atau *niche* (Li & Bhatia, 2011). Faktor-faktor yang terlibat dalam *niche* tersebut diantaranya: sel endotel dan sel inflamasi, matriks ekstraselular, faktor pertumbuhan, sitokin, hormon dan sinyal dari lingkungan (Lucas *et al.*, 2018). Sel punca yang bermigrasi tersebut dapat bergerak secara mandiri maupun berkelompok (Montell *et al.* 2011). Sumber sel punca dalam studi migrasi sel banyak dilaporkan berasal dari jaringan dewasa. Beberapa sel punca yang berasal dari jaringan dewasa adalah sel punca asal otot, saraf, tali pusat (*umbilical cord* /UCSC), darah, jaringan lemak (*adipose derived stem cells*/ADSCs) dan sumsum

tulang (*bone marrow stem cells* / BMSCs) (Zuk, 2010; Mennan *et al.*, 2013; Zhao dan Zhang, 2014).

ADSCs memiliki karakteristik yang hampir serupa dengan BMSCs. ADSCs memiliki kelebihan dibanding BMSCs jika diamati berdasarkan jumlah sel punca yang lebih banyak dengan prosedur yang lebih mudah, risiko yang rendah, sedikit nyeri dan sedikit trauma (Zhu *et al.* 2008). Oleh karena itu, pada studi ini digunakan ADSCs sebagai model sel punca. Adapun tujuan dari studi ini adalah mengetahui kemampuan migrasi ADSCs secara *in vitro* pada berbagai medium standar pertumbuhan sel. Kelompok medium pertumbuhan tersebut mengandung nutrisi *fetal bovine serum* (FBS), kombinasi FBS dan *L-ascorbic acid* (LAA), dan *platelet-rich plasma* (PRP). Ketiga nutrisi medium tersebut telah banyak dilaporkan dapat mendukung pertumbuhan dan diferensiasi sel punca (Meinel *et al.*, 2004; Amable *et al.*, 2014; Stessuk *et al.*, 2016), sedangkan teknik yang digunakan dalam memahami proses migrasi sel adalah teknik goresan luka (Bobadilla *et al.*, 2018; Stessuk *et al.*, 2016; Yue *et al.*, 2010). Teknik ini dikembangkan untuk melihat laju migrasi terhadap lamanya waktu pengamatan.

Metode Penelitian

1. Isolasi dan Kondisi Kultur ADSCs

Adipose-derived stem cells (ADSCs) diisolasi dari jaringan lemak manusia yang berasal dari dua donor. Isolasi ADSCs menggunakan teknik enzimatik yang mengacu pada protokol H-Remedy dari Yayasan Hayandra Peduli (Nomor Paten: IDP000055609). Sebanyak 10% enzim H-Remedy ditambahkan pada sampel jaringan lemak dan diinkubasi pada suhu 37°C, 300 rpm, selama 1 jam. Enzim kemudian diinaktivasi dengan menambahkan medium *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) rendah glukosa (1 g/L) mengandung L-glutamin (4 mM) (Gibco, USA) dan disentrifugasi pada kecepatan 600xg selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk pada lapisan bagian atas kemudian dibuang dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 600 xg selama 5 menit.

Pelet sel mengandung ADSCs kemudian dikultur menggunakan medium DMEM yang mengandung 1% *antibiotic-antimycotic* (ABAM) 100X (Gibco, USA) dan 10% *fetal bovine serum* (FBS) (Gibco, USA) pada suhu 37°C, 5% CO₂. ADSCs dikultur dan diremajakan hingga pasase 4 (P4) dengan penggantian medium setiap 2-3 hari sekali. ADSCs kemudian digunakan untuk uji selanjutnya yaitu migrasi sel pada P4. Penelitian ini telah lulus kaji etik dengan nomor 666/UN6.C.10/PN/2017 oleh Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung.

2. Medium Kelompok Perlakuan ADSCs

Sebanyak 1×10^4 ADSCs dikultur pada 24 *well-plate* (NEST) dalam berbagai medium yaitu:

- DMEM (Gibco, USA) + 1% ABAM (Gibco, USA) + 0,1% FBS (Gibco, USA) disebut medium kontrol,
- DMEM (Gibco, USA) + 1% ABAM (Gibco, USA) + 10% FBS (Gibco, USA) disebut medium 10% FBS,
- DMEM (Gibco, USA) + 1% ABAM (Gibco, USA) + 10% FBS (Gibco, USA) dan *L-ascorbic acid* (Sigma-Aldrich) disebut medium 10% FBS-LAA.
- DMEM (Gibco, USA) + 1% ABAM (Gibco, USA) + 10% PRP disebut medium 10% PRP.

Sel diamati pertumbuhannya hingga mencapai konfluensi lebih dari 80%. Sel kemudian dilakukan goresan untuk membuat luka.

3. Uji Migrasi ADSCs

ADSCs yang telah dikultur pada berbagai medium sel kemudian diberi goresan/luka sebanyak satu kali goresan pada *well* menggunakan tips ukuran 200µl yang steril (Gen Follower). Ujung tips 200µl diposisikan pada bagian ujung atas *well*, kemudian dilakukan penggoresan secara vertikal. Prosedur yang sama dilakukan pada setiap kelompok perlakuan dengan variasi medium pertumbuhan. Sel kemudian dicuci menggunakan *Hanks' Balanced Salt solution* (HBSS) (Gibco, USA) untuk membuang

debris atau sel-sel mati akibat goresan luka. Sel kemudian dikultur menggunakan keempat kelompok variasi medium.

4. Pengambilan Gambar dan Analisis Data

Gambar diambil pada jam ke-0 sesaat setelah pembuatan goresan/luka pada ADSCs yang digunakan sebagai data luas area awal ADSCs. Proses penutupan goresan/luka ADSCs *monolayer* terhadap luas area migrasi sel diamati pada jam ke-3, 6, 15 dan 24 ($t = \Delta h$). Gambar diambil menggunakan mikroskop inverted fasa terbalik (OPTIKA, ITALY; objektif 10x) dengan kamera digital OPTIKA (OPTIKA, ITALY). Luas area luka dikuantifikasi menggunakan perangkat lunak ImageJ (National Institutes of Health, USA). Migrasi sel terhadap penutupan goresan/luka ditampilkan dalam bentuk *folding* (kali lipat).

Rumus luas area goresan/luka pada ADSCs sebagai berikut:

$$\text{Luas Luka (mm}^2\text{)} = \frac{(\text{Areat} = 0h) - (\text{Areat} = \Delta h)}{(\text{Areat} = 0h)}$$

Keterangan:

- Area $t = 0$ h adalah luas area yang diukur setelah dilakukan penggoresan pada jam ke 0;
- Area $t = \Delta h$ adalah luas area penutupan luka yang dihitung pada jam ke 3, 6, 15 dan 24;
- h (*hour*) adalah satuan dari jam.

Rumus penutupan goresan/luka pada ADSCs sebagai berikut:

$$\text{Penutupan Luka ADSCs} = \frac{\text{Luas area } \Delta h}{\text{Luas area } 0h}$$

Keterangan:

- Luas Area Δh adalah luas area yang diukur setelah dilakukan penggoresan yaitu jam ke 0, 3, 6, 15 dan 24;
- Luas area $0h$ adalah luas area yang diukur setelah dilakukan penggoresan pada jam ke 0;

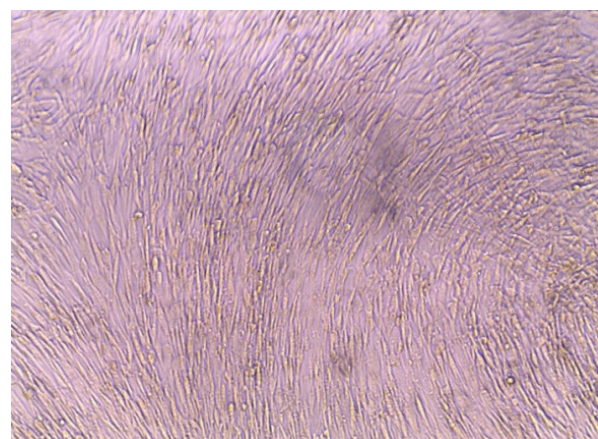
5. Analisis Statistik

Data yang didapat ditampilkan dalam bentuk gambar dan grafik (dinyatakan dalam rerata \pm standar deviasi (SD)). Analisis statistik dimulai dengan uji normalitas dan homogenitas. Analisis perbedaan menggunakan uji statistik parametrik *analysis of variance* (ANOVA).

Hasil dan Pembahasan

1. Morfologi ADSCs

Karakteristik ADSCs pada studi ini adalah berbentuk seperti sel fibroblas dan menempel pada dasar substrat (cawan *polystyrene*) (Gambar 1). Karakter tersebut sesuai konsensus standar dari salah satu ciri sel punca (Dominici *et al.* 2006). Kerapatan densitas sel yang tinggi menjadi syarat dalam mempelajari migrasi sel secara *in vitro* sesuai data yang telah dilaporkan oleh Bobadilla *et al.* (2018), Huang *et al.* (2019), Murphy *et al.* (2012) dan Park *et al.* (2011). Pada studi ini, kerapatan dan konfluensi sel pasase 4 adalah lebih dari 90%. Kerapatan dan densitas jumlah ADSCs yang tinggi digunakan untuk meminimalkan celah antar sel yang dapat terkuantifikasi menggunakan ImageJ sebagai area goresan. Goresan yang dibuat pada ADSCs yang dikultur secara *monolayer* digunakan untuk mengkuantifikasi laju migrasi sel.



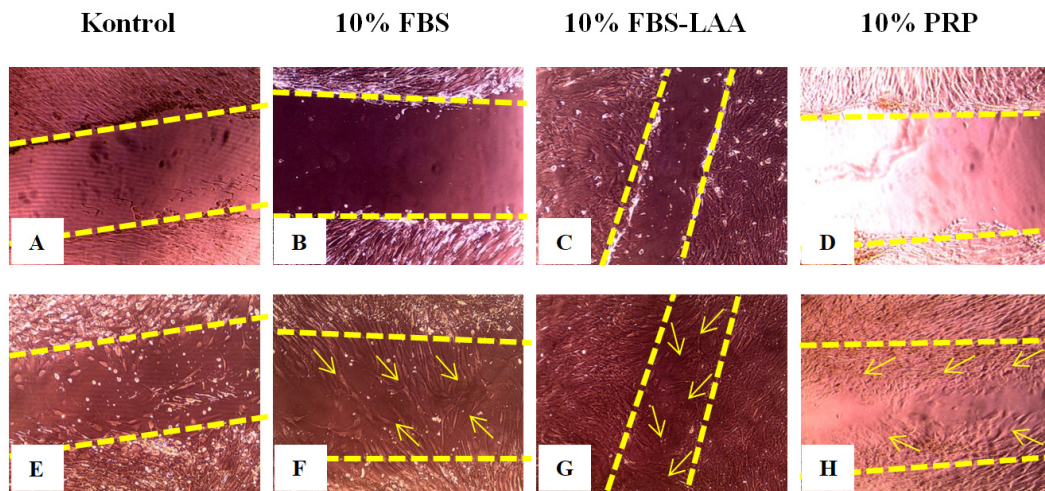
Gambar 1. Morfologi ADSCs yang dikultur pada polystyrene dengan kerapatan sel yang tinggi (bar = 200 μ m)

2. Laju Migrasi ADSCs

Luas goresan awal ADSCs sangat beragam yang secara representatif ditunjukkan pada

Gambar 2 (A-D). Hasil tersebut diduga karena adanya variasi arah juluran sel. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Bobadilla *et al.* (2018) yang menunjukkan bahwa teknik goresan ini diduga juga dipengaruhi oleh posisi sel (horizontal atau vertikal) dari arah goresan. Pada jam ke-24, ADSCs yang telah diberi perlakuan goresan

pada setiap kelompok berangsur bermigrasi untuk menutup area luka. Hal tersebut juga diamati pada kelompok kontrol (Gambar 2 E-H). Migrasi sel sendiri akan terjadi akibat respons sel terhadap lingkungan mikro eksternal sel (Horwitz dan Webb, 2003).



Gambar 2. Migrasi sel ADSCs pada berbagai kelompok selama 24 jam; terdiri dari kelompok kontrol (A,E); kelompok 10% FBS (B,F); kelompok 10% FBS-LAA (C,G); dan kelompok 10% PRP (D,H); pada pengamatan 0 jam (A-D) dan pengamatan 24 jam (E-H) setelah dilakukan goresan menggunakan tips 200µm; garis putus-putus berwarna kuning adalah area goresan awal yang terbentuk; panah kuning menunjukkan migrasi ADSCs

Data kuantifikasi luas goresan ADSCs dalam satuan mm² disajikan pada Tabel 1. Luas goresan yang terbentuk dari kecil ke besar pada jam ke-0 secara berturut-turut adalah kelompok ADSCs FBS-LAA, ADSCs kontrol, ADSCs PRP, dan ADSCs FBS. Pengamatan jam ke-6 kelompok kontrol dan 10% FBS menunjukkan adanya peningkatan luas goresan dibandingkan pada jam ke-3, namun tidak teramati pada

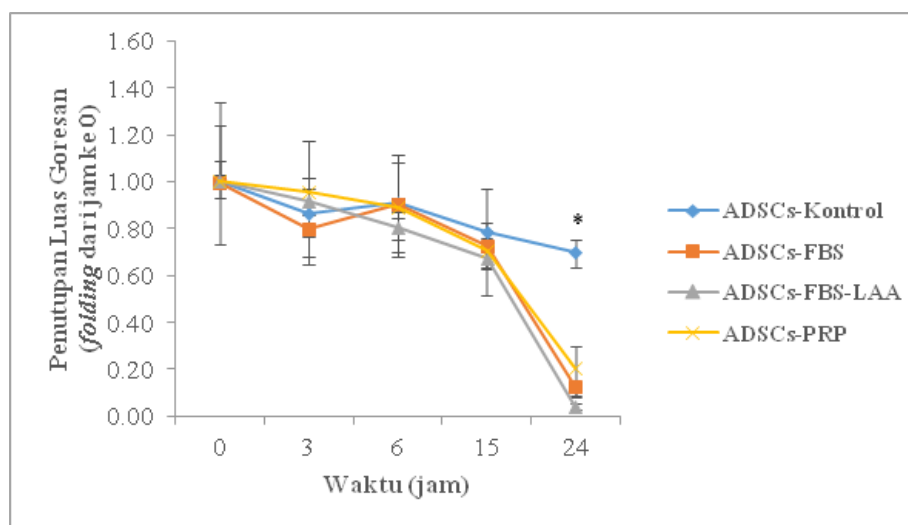
kelompok PRP dan FBS-LAA. Kecenderungan penutupan goresan oleh ADSCs pada jam ke 24 dari luas terkecil ke besar secara berturut-turut adalah kelompok FBS-LAA, FBS, PRP kemudian kontrol. Pada kelompok kontrol, luas goresan ADSCs pada jam ke 24 lebih besar dibandingkan ketiga kelompok lain, meskipun luas goresan awal lebih kecil dibandingkan kelompok PRP dan FBS.

Tabel 1. Luas goresan/luka ADSCs pada kelompok kontrol, 10% FBS, 10% FBS-LAA dan 10% PRP pada pengamatan jam ke-0, 3, 6, 15, dan 24

Waktu (jam)	Luas Goresan (mm ²)			
	Kontrol ± SD	ADSCs-FBS ± SD	ADSCs-FBS-LAA ± SD	ADSCs-PRP ± SD
0	0,978 ± 0,026	1,379 ± 0,227	0,376 ± 0,082	1,023 ± 0,310
3	0,845 ± 0,132	1,101 ± 0,193	0,346 ± 0,057	0,980 ± 0,254
6	0,890 ± 0,034	1,250 ± 0,191	0,304 ± 0,050	0,913 ± 0,219
15	0,771 ± 0,034	1,006 ± 0,088	0,254 ± 0,064	0,724 ± 0,236
24	0,683 ± 0,062	0,176 ± 0,039	0,016 ± 0,014	0,211 ± 0,106

Tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok FBS, FBS-LAA dan PRP pada setiap pengamatan penelitian. Luas penutupan goresan pada jam ke-6 kelompok kontrol dan 10% FBS cenderung meningkat yaitu masing-masing 1,05x dan 1,14x dibandingkan jam ke-3. Akan tetapi, luas penutupan goresan pada kelompok PRP dan FBS-LAA cenderung mengalami penurunan sebesar 0,93x dan 0,88x dibandingkan pada pengamatan jam ke-3.

Kelompok ADSCs kontrol, FBS, FBS-LAA dan PRP pada berbagai medium mengalami penutupan goresan selama 24 jam pengamatan. Pada jam ke-24 luas goresan ADSCs adalah 0,70x, 0,13x, 0,04x, dan 0,21x dibandingkan jam ke-0 (1,00x) pada kelompok kontrol, FBS, FBS-LAA dan PRP secara berurutan. Luas goresan kelompok kontrol pada jam ke-24 lebih besar secara signifikan dibandingkan ketiga kelompok perlakuan lainnya.



Gambar 3. Laju migrasi ADSCs terhadap penutupan goresan luka secara *in vitro* menggunakan berbagai medium pertumbuhan yaitu 0,1% FBS sebagai kontrol dan 10% FBS, 10% FBS-LAA, serta 10% PRP sebagai kelompok perlakuan dalam medium mengandung rendah glukosa dan diamati pada jam ke-3, 6, 15, 24; satuan penutupan luka adalah “kali lipat” luas dari jam ke-0 (*signifikan dengan $p < 0,05$)

Berdasarkan hasil tersebut migrasi sel dipengaruhi oleh lingkungan mikro eksternal sel yang dapat terdiri dari medium pertumbuhan sehingga sel mengalami polarisasi dan perluasan ukuran sel. Lingkungan mikro ADSCs dengan suplementasi FBS, FBS+LAA atau PRP akan mengandung beberapa protein sebagai contoh *fibroblast growth factor* (FGF) yang berperan dalam pertumbuhan sel. Pada kondisi ideal, protein FGF dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) juga dapat disekresikan oleh ADSCs untuk digunakan kembali (autokrin) terhadap respon pembelahan sel (Gentile 2012; Wang dkk., 2006). Oleh karena itu, rendahnya nutrisi (0,1%) pada kelompok kontrol menyebabkan laju migrasi sel menjadi lambat yaitu hanya 30,11% selama 24 jam pengamatan. Migrasi sel sendiri dapat didukung oleh beberapa protein

(kemoatraktan) seperti PDGF-AA dan TGF- β 1 yang dibuktikan pada sel fibroblas dan keratin (Schneider *et al.* 2010; Rahimi & Leof, 2007)

Kemoatraktan PDGF-AA yang dikeluarkan dari medium seperti PRP memberikan peran penting terhadap induksi migrasi fibroblas (Schneider *et al.*, 2010). Protein TGF- β 1 juga diduga memiliki peran terhadap peningkatan laju migrasi sel keratin melalui jalur *epithelial-to-mesenchymal transformation* (EMT) (Rahimi & Leof, 2007). Studi *in vitro* yang dilaporkan Huang *et al.* (2019) menunjukkan bahwa mikrosikel (MIV) ADSCs dapat meningkatkan laju migrasi dan invasi *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) dengan menurunkan luka goresan hingga dibawah 5% dibandingkan kontrol selama 24 jam pengamatan. Studi lain menggunakan sel

keratin dan fibroblas yang dikultur selama 24 jam mengalami peningkatan migrasi sel hingga 60% dan 35% (Park *et al.* 2011). Pemanfaatan PRP dari manusia untuk menguji kemampuan migrasi sel punca asal sumsum tulang dilaporkan oleh Murphy *et al.* (2012) dan hasilnya menunjukkan penutupan goresan yang lebih baik jika dibandingkan menggunakan FBS sebagai nutrisi pertumbuhan.

Pada studi ini, migrasi ADSCs menggunakan PRP cenderung lebih lambat namun tidak signifikan jika dibandingkan dengan suplemen FBS. Kombinasi nutrisi FBS dan LAA menunjukkan hasil yang maksimal dalam proses migrasi ADSCs. Faktor variasi setiap *batch* dan donor PRP diduga yang mempengaruhi kadar protein pertumbuhan yang berperan dalam migrasi ADSCs. Laju migrasi ADSCs PRP yang lebih rendah dari FBS diduga mengandung protein yang

berperan dalam migrasi sel pada kadar yang tidak optimal.

Simpulan

Adipose-derived stem cells (ADSCs) memiliki kemampuan untuk bermigrasi pada medium rendah glukosa yang mengandung FBS, FBS-LAA atau PRP dengan laju migrasinya yang lebih cepat dibandingkan jika ADSCs dikultur pada medium kontrol.

Ucapan Terimakasih

Peneliti mengucapkan terimakasih pada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) Kementerian Keuangan Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui pemberian Beasiswa Tesis, sesuai dengan Nota Perjanjian nomor: PRJ-1332 /LPDP.3/2016.

Daftar Pustaka

- Amable, P.R., M.V. Teixeira, R.B. Carias, J.M. Granjeiro, R. Borojevic 2014. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. *PloS one*. 9(8):e104662.
- Bobadilla, A.V., J. Arévalo, E. Sarró, H. Byrne, P.K. Maini, T. Carraro, S. Balocco, A. Meseguer, T. Alarcón. 2018. Local migration quantification method for scratch assays. *J. Royal Soc. Interface*. 1-18.
- de Lucas, B., L.M. Pérez, B.G. Gálvez. 2018. Importance and regulation of adult stem cell migration. *J. cell. mol. med.* 22(2):746-54.
- Dominici, M.L.B.K., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C. Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, E.M. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytother*. 8(4):315-317.
- Gentile, P. 2012. Concise Review: Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic and Clinical Implications for Tissue Engineering Therapies in Regenerative Surgery. *Stem cells transl med.* 1(3):230-236.
- Horwitz, R., D. Webb. 2003. Cell migration. *Cur. Bio.* 13(19):R756-759.
- Huang, B., L.F. Huang, L. Zhao, Z. Zeng, X. Wang, D. Cao, L. Yang, Z. Ye, X. Chen, B. Liu, T.C. He. 2019. Microvesicles (MIVs) secreted from adipose-derived stem cells (ADSCs) contain multiple microRNAs and promote the migration and invasion of endothelial cells. *Genes & Dis*. 1-10.
- Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, K. Bieback. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*. 24(5): 1294-1301.

- Li, L., R. Bhatia. 2011. Stem cell quiescence. *Clinic. cancer res.* 17(15):4936-4941.
- Meinel, L., S. Hofmann, V. Karageorgiou, L. Zichner, R. Langer, D. Kaplan, G. Vunjak-Novakovic. 2004. Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotech. Bioeng.* 88(3): 379-391.
- Mennan, C., K. Wright, A. Bhattacharjee, B. Balain, J. Richardson, S. Roberts. 2013. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *BioMed res. intern.* 2013: 1-8.
- Montell, D.J., W.H. Yoon, M. Starz-Gaiano. 2012. Group choreography: mechanisms orchestrating the collective movement of border cells. *Nat. rev. Mol. cell bio.* 13(10):631-645.
- Murphy, M.B., D. Blashki, R.M. Buchanan, I.K. Yazdi, M. Ferrari, P.J. Simmons, E. Tasciotti. 2012. Adult and umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma for mesenchymal stem cell proliferation, chemotaxis, and cryo-preservation. *Biomaterials.* 33(21):5308-5316.
- Nicoletti, G.F., F. De Francesco, F. D'Andrea, G.A. Ferraro. 2015. Methods and procedures in adipose stem cells: state of the art and perspective for translation medicine. *J. cell. physiol.* 230(3): 489-495.
- Park, H.B., J.H. Yang, K.H. Chung. 2011. Characterization of the cytokine profile of platelet rich plasma (PRP) and PRP-induced cell proliferation and migration: Upregulation of matrix metalloproteinase-1 and-9 in HaCaT cells. *Korean J. Hematol.* 46(4):265-273.
- Robertson, J.A. 2010. Embryo stem cell research: ten years of controversy. *J Law, Med & Ethics.* 38(2):191-203.
- Stessuk, T., M.B. Puzzi, E.A. Chaim, P.C.M. Alves, E.V. de Paula, A. Forte, J.M. Izumizawa, C.C. Oliveira, F. Frei, J.T. Ribeiro-Paes. 2016. Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Archiv. Dermatol. Res.* 308(7):511-520.
- Wang, Y., E. Bella, C.S. Lee, C. Migliaresi, L. Pelcastre, Z. Schwartz, B.D. Boyan, A. Motta. 2010. The synergistic effects of 3-D porous silk fibroin matrix scaffold properties and hydrodynamic environment in cartilage tissue regeneration. *Biomaterials.* 31(17):4672-4681.
- Yue, P.Y., E.P. Leung, N.K. Mak, R.N. Wong. 2010. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. *J. biomol. screening.* 15(4):427-433.
- Zhao, L.R., J.H. Zhang. 2014. *Cellular Therapy for Stroke and CNS Injuries.* Springer.
- Zhu, Y., T. Liu, K. Song, X. Fan, X. Ma, Z. Cui. 2008. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell biochem. funct.* 26(6): 664-675.
- Zuk, P.A. 2010. The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead. *Mol Bio Cell.* 21:1783-1787.