

Efek suplementasi insulin pada media non serum dalam kultur 3D sel punca mesenkimal pulpa gigi

Fuad Gandhi Torizal

Program Studi Bioteknologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, Indonesia
UCLA Dental Hospital, School of Dentistry, The University of California, Los Angeles, USA
*Email: t_gandhi@unisayogya.ac.id

Abstrak

Sel punca mesenkimal yang berasal dari pulpa gigi (DPSCs) merupakan kandidat yang menjanjikan dalam terapi berbasis sel maupun terapi berbasis sekretom, karena kemampuannya dalam memperbaiki jaringan dan mensekresikan berbagai molekul bioaktif. Namun, praktik kultur saat ini sebagian besar masih bergantung pada media berbasis serum, yang dapat menyebabkan variabilitas dan potensi transmisi komponen xenogenik dan patogen terhadap manusia, sehingga membatasi aplikasinya dalam terapi. Meskipun media non serum berbasis protein rekombinan menawarkan solusi alternatif untuk mengatasi masalah ini, media ini sering kali mengakibatkan penurunan laju proliferasi, yang menjadi kendala dalam produksi skala besar. Studi ini mengeksplorasi potensi suplementasi insulin dalam media non serum untuk meningkatkan proliferasi dalam kultur suspensi 3D *spheroid* DPSCs. Hasil analisis menunjukkan bahwa penambahan insulin pada media non serum tidak hanya memulihkan, tetapi juga meningkatkan laju proliferasi, sehingga setara atau bahkan melampaui proliferasi yang diamati pada media berbasis serum dengan 10% FBS. Berdasarkan analisis *immunophenotyping*, suplementasi insulin mampu mempertahankan multipotensi serta karakteristik MSC selama periode kultur. Selain itu, peningkatan sekresi molekul imunomodulator pada media non serum yang disuplai insulin relatif meningkat dibandingkan dengan kondisi kultur konvensional. Sistem media non serum berbasis insulin yang disajikan dalam studi ini memberikan konsep metodologi kultur optimal dalam meningkatkan produksi DPSCs serta hasil produk terapeutiknya. Pendekatan ini mengatasi tantangan utama dalam kultur DPSCs non serum dan merupakan langkah signifikan menuju pengembangan proses biomanufaktur skala besar, efisien, dan relevan secara klinis. Hasil ini membuka peluang untuk penelitian lebih lanjut dalam optimalisasi kondisi kultur DPSCs, yang berpotensi mempercepat realisasi terapi berbasis DPSCs berbasis laboratorium ke aplikasi klinis.

Kata kunci: Sel punca pulpa gigi, media non serum, suplementasi insulin, kultur *spheroid* 3D, proliferasi sel.

The Effect of insulin supplementation in serum-free media towards 3D culture of dental pulp mesenchymal stem cells

Abstract

Mesenchymal stem cells derived from dental pulp (DPSCs) have emerged as promising candidates for both autologous cell-based and cell-free therapies, owing to their capacity to secrete a wide array of bioactive molecules. However, current culture practices predominantly rely on serum-based media, which introduce variability and potential xenogeneic components, thereby limiting their applicability for therapeutic use. While serum-free media offer an alternative solution to mitigate these issues, they often result in reduced proliferation rates, hindering large-scale production. This study investigates the feasibility of incorporating insulin into serum-free media to enhance proliferation in 3D spheroid suspension cultures of DPSCs. Our results demonstrate that the addition of insulin to serum-free media not only restores but also improves proliferation rates, matching or surpassing those observed in 10% FBS serum-based media. Importantly, insulin supplementation preserves multipotency and maintains MSC characteristics throughout the culture period. Furthermore, we observed an increased secretion of immunomodulatory molecules in insulin-supplemented serum-free media compared to traditional culture conditions. The insulin-based serum-free media system presented here offers a proof of concept for an optimized culture methodology that enhances DPSCs production and improves the yield of their secreted therapeutic products. This approach addresses key challenges associated with serum-free DPSC culture and represents a significant step towards developing scalable, efficient, and clinically relevant biomanufacturing processes. Our findings pave the way for future research into the optimization of DPSC culture conditions, potentially accelerating the translation of DPSC-based therapies from bench to bedside.

Keywords: *Dental pulp stem cells, serum-free media, insulin supplementation, 3D spheroid culture, cell proliferation.*

1. Pendahuluan

Sel punca pulpa gigi (DPSCs) merupakan sumber potensial untuk terapi transplantasi berbasis sel dan terapi non seluler berbasis sekretom, terutama karena sifat imunomodulasinya (Torizal et al., 2022). Sel punca multipoten ini berasal dari jaringan pulpa gigi, menunjukkan potensi yang baik dalam bidang kedokteran regeneratif, tidak hanya terbatas pada aplikasi odontologi tetapi juga dalam regenerasi kulit dan penyembuhan luka. Aksesibilitas DPSCs dari gigi yang diekstraksi, yang sering dianggap sebagai limbah medis, menjadikannya sumber sel punca mesenkimal (MSCs) yang hemat biaya dan mudah diperoleh untuk penelitian serta aplikasi terapeutik (Torizal et al., 2024).

Dalam beberapa tahun terakhir, kultur *spheroid* tiga dimensi (3D) telah menjadi standar dalam biomanufaktur sel skala besar karena efisiensinya dalam proses propagasi sel serta produk sekretifnya dengan biaya yang lebih rendah. Metode ini merepresentasikan lingkungan mikro yang lebih identik dari lingkungan alami jaringan secara *in vivo* (dalam tubuh), yang memungkinkan interaksi sel-sel yang lebih optimal dibandingkan dengan kultur monolayer konvensional. Pendekatan kultur 3D *spheroid* telah terbukti bermanfaat dalam meningkatkan produksi DPSCs dan sekretomnya untuk berbagai aplikasi terapeutik.

Meskipun teknologi ini terus berkembang, masih terdapat beberapa kendala dalam kultur DPSCs. Secara konvensional, media berbasis serum yang mengandung 10% *fetal bovine serum* (FBS) telah banyak digunakan (Wang et al., 2024). Namun, pendekatan ini menimbulkan kekhawatiran terkait potensi kandungan material xenogenik dari hewan, yang dapat menyebabkan infeksi silang oleh patogen seperti virus atau prion. Selain itu, penggunaan FBS dapat menyebabkan variabilitas antar periode kultur, yang menyulitkan standarisasi protokol produksi DPSCs (de Almeida Fuzeta et al., 2020; Pachler et al., 2017).

Untuk mengatasi permasalahan ini, formulasi media non serum (*serum-free/SF*) telah dikembangkan sebagai alternatif. Media ini umumnya terdiri dari media basal, seperti α MEM, yang disuplai dengan berbagai faktor pertumbuhan rekombinan, termasuk *fibroblast growth factor 2* (FGF2), *platelet-derived growth factor* (PDGF), dan *epidermal growth factor* (EGF) (Moniem et al., 2019; Wang et al., 2024). Meskipun pendekatan ini mengurangi banyak keterbatasan yang terdapat pada media berbasis serum, kultur sel dalam kondisi non serum sering mengalami penurunan laju proliferasi dan waktu penggandaan sel yang lebih lama dibandingkan dengan kultur yang mengandung serum (Wang et al., 2024).

Insulin merupakan faktor pertumbuhan yang umum digunakan dalam media kultur untuk meningkatkan proliferasi melalui aktivasi reseptor siklus sel. Komponen ini telah menunjukkan potensi dalam berbagai aplikasi kultur sel (Bendall et al., 2007). Namun, efek spesifik insulin terhadap kultur DPSCs masih belum diteliti secara mendalam. Studi ini bertujuan untuk mengeksplorasi efek suplementasi insulin dalam media non serum terhadap proliferasi, pemeliharaan sifat stemness dan multipotensi, serta sekresi faktor imunomodulator terapeutik dari DPSCs.

2. Metode

2.1. Teknik Kultur Jaringan Suspensi 3D Spheroid

Sebanyak 10^6 DPSCs dari gigi molar ketiga diinokulasi ke dalam setiap well pada 24- AggreWell 800 plate (Stemcell Technologies, USA) menggunakan α MEM yang mengandung 20 ng/mL FGF2, 10 ng/mL EGF, dan 10 ng/mL PDGF (R&D Biosystems, USA) sesuai protokol dari produsen. Kultur tersebut diinkubasi dalam inkubator dengan 5% O₂ pada suhu 37°C selama 24 jam untuk membentuk *spheroid*.

Komparasi media kultur dilakukan dengan memisahkan formulasi media menjadi tiga kelompok. Kelompok pertama menggunakan media berbasis serum, yaitu α MEM yang mengandung 10% FBS. Kelompok kedua menggunakan media non serum (SF) yang terdiri dari α MEM dengan tambahan 20 ng/mL FGF2, 10 ng/mL EGF, dan 10 ng/mL PDGF. Kelompok ketiga menggunakan media non

serum dengan insulin (SF+Ins), yaitu α MEM yang mengandung 20 ng/mL FGF2, 10 ng/mL EGF, 10 ng/mL PDGF, dan 10 μ g/mL insulin.

Spheroid yang telah terbentuk kemudian dipindahkan ke masing-masing sumur dalam 6 well plate dengan 4 mL kultur media dari setiap formulasi. Kultur 3d *spheroid* tersebut diinkubasi pada 5% O₂ pada suhu 37°C dan ditempatkan pada rotary shaker dengan kecepatan 90 rpm selama 7 hari, dengan penggantian media dilakukan setiap 48 jam.

2.2. Kuantifikasi sel dan Observasi Morfologi

Spheroid diamati dan didokumentasikan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus, Jepang). Untuk menentukan jumlah sel, *spheroid* dikumpulkan dan didisosiasi menggunakan reagen disosiasi Accutase (Thermo Fisher Scientific) selama 10 hingga 15 menit pada suhu 37°C, diikuti dengan homogenisasi melalui pipetasi secara perlahan. Sel-sel yang telah terdisosiasi kemudian dihitung menggunakan hemositometer (Tatai-type, Jepang).

2.3. Immunophenotyping dengan metode Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Disosiasi *Spheroid* DPSCs dilakukan dengan inkubasi dalam larutan Accutase (Stemcell Technologies) selama 30 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya, suspensi sel diperoleh melalui disosiasi fisik dengan *pipetting* dan pemisahan agregat menggunakan cell strainer 40 μ m (Corning, New York, USA), kemudian jumlah sel dihitung menggunakan hemositometer. Sebanyak 10⁶ sel difiksasi dengan 1 mL paraformaldehida 4%, diikuti dengan permeabilisasi menggunakan 0,2% Triton X dalam PBS yang mengandung 5% FBS. Sel-sel tersebut kemudian dilabel dengan antibodi primer spesifik untuk masing-masing penanda (human anti-CD90, CD105, OCT4, SOX2, NANOG, SSEA4, dan CK19), diikuti oleh pewarnaan dengan antibodi sekunder Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, USA). Sampel selanjutnya dianalisis menggunakan flow cytometer (Beckman Coulter, USA).

2.4. Deteksi dan Kuantifikasi Sekretom Imunomodulatori dalam media kultur menggunakan Cytometric Bead Array

Cytometric bead array dilakukan untuk menentukan kadar sitokin dan faktor pertumbuhan dalam media terkondisi. LEGENDplex Human Essential Immune Response Panel (13-plex) (BioLegend, USA) digunakan untuk mendeteksi sitokin, termasuk IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, CXCL-8, CXCL-10, CCL2, IFN- γ , TGF- β 1, dan TNF- α . Protokol analisis dilakukan sesuai dengan panduan dari produsen. 25 μ L media terkondisi diinkubasi dengan microbeads, kemudian diikuti dengan penambahan antibodi deteksi. Kandungan sitokin dalam sampel media kemudian di kuantifikasi menggunakan flow cytometer. Data dianalisis menggunakan perangkat lunak LEGENDplex™ Data Analysis Software.

3. Hasil dan Pembahasan

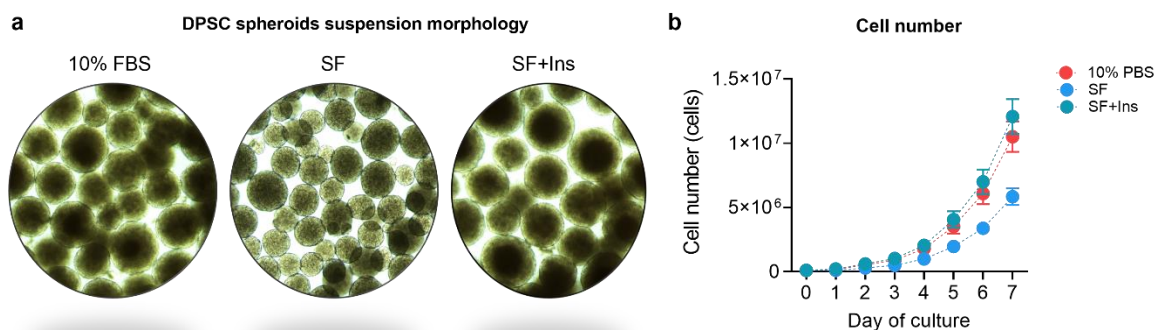
3.1. Peningkatan Proliferasi pada Media Non Serum dengan Suplementasi Insulin

Hasil penelitian menunjukkan dampak signifikan komposisi media terhadap proliferasi sel dalam struktur 3D *spheroid* selama periode kultur 7 hari (Gambar 1a dan 1b). Penambahan insulin pada media SF menghasilkan peningkatan proliferasi yang sebanding dengan media yang mengandung FBS. Temuan ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyoroti peran insulin sebagai faktor mitogenik yang kuat. Insulin mengaktifkan jalur sinyal penting, seperti, yang mendorong pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel (Zhou et al., 2023). Kemampuan insulin untuk meningkatkan proliferasi dalam kondisi bebas serum sangat relevan untuk pengembangan media yang terdefinisi secara kimia untuk kultur sel, yang penting untuk aplikasi yang memerlukan kontrol tepat atas kondisi kultur (Ren et al., 2016).

Setelah 7 hari kultur, pembentukan *spheroid* diamati baik pada media FBS 10% maupun media SF yang ditambah insulin (SF+Ins). *Spheroid* dalam kondisi ini tampak lebih besar selama pengamatan, menunjukkan peningkatan pertumbuhan dan agregasi sel (Gambar 1a). Hal ini menunjukkan bahwa insulin dapat secara efektif menggantikan beberapa faktor pendorong pertumbuhan yang biasanya disediakan oleh FBS dalam kultur sel (Torizal et al., 2021).

Efektivitas insulin dalam media non serum didukung oleh hasil yang menggunakan Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) sebagai pengganti serum. Penelitian telah menunjukkan bahwa media ITS dapat mendukung proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel yang sebanding dengan media yang mengandung FBS (Gam. Hal ini sangat penting untuk mengurangi ketergantungan pada komponen yang berasal dari hewan dalam kultur sel, mengatasi masalah etika dan kebutuhan akan kondisi kultur yang lebih terstandar (Torizal et al., 2022).

Gambar

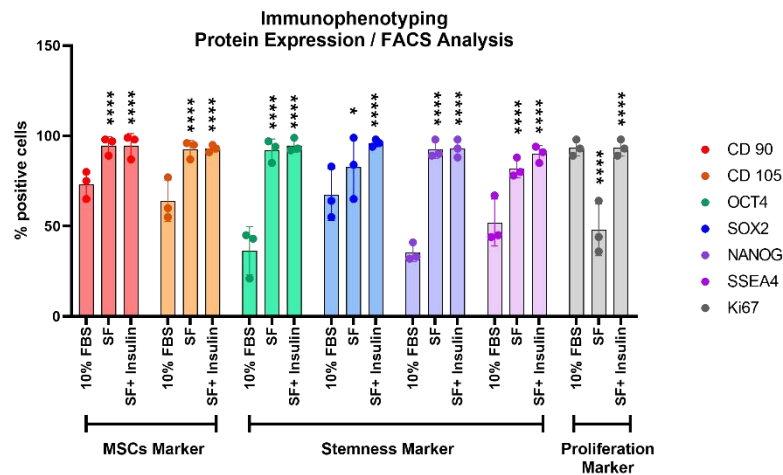


Gambar 1. Proliferasi DPSCs dalam kultur suspensi dengan tiga formulasi medium yang berbeda: (a) Morfologi 3D *spheroid* DPSCs dan (b) Proliferasi sel dalam 7 hari kultur perbanyakan.

3.2. Penambahan Insulin dalam Media Non Serum Tidak Mempengaruhi Stemness, Sifat MSC, serta Ekspresi Faktor Transkripsi Proliferasi

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa karakteristik sel punca pulpa gigi (DPSCs) dapat berubah secara dinamis dalam berbagai kondisi media. Pada media dengan 10% FBS, terjadi penurunan signifikan ekspresi penanda MSC (CD90 dan CD105) yang disertai dengan penurunan ekspresi penanda stemness (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA4). Fenomena ini dapat dijelaskan oleh adanya berbagai komponen tidak terdefinisi/sulit terkuantifikasi serta beragam dalam serum yang berpotensi memicu diferensiasi spontan dan tidak terkendali seiring waktu. Sebaliknya, DPSCs yang dikultur dalam media non serum (serum-free/SF) menunjukkan peningkatan ekspresi penanda tersebut, yang mengindikasikan pemeliharaan karakteristik sel punca yang lebih stabil. Namun, hal ini menyebabkan penurunan ekspresi gen proliferasi, sehingga mengganggu keseimbangan kompleks antara stemness dan pertumbuhan dalam kondisi kultur sel.

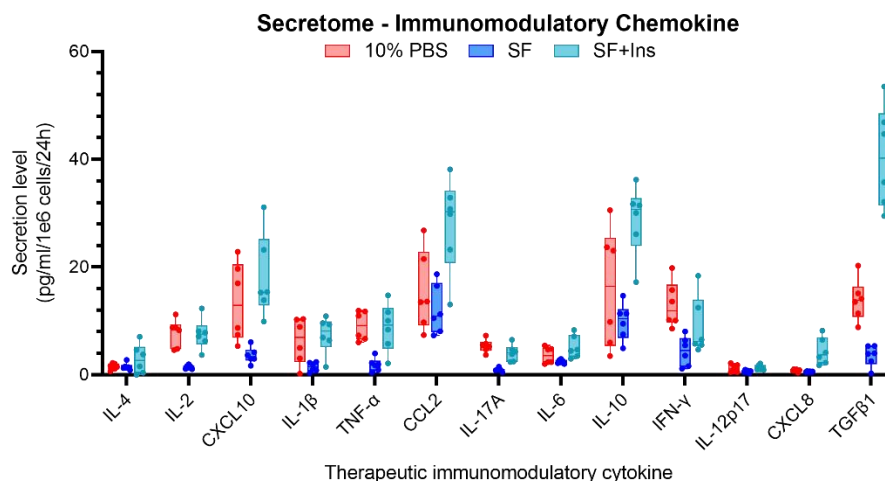
Menariknya, penambahan insulin ke dalam media non serum mampu mengembalikan ekspresi gen proliferasi tanpa mempengaruhi penanda MSC dan stemness. Efek ini dapat dijelaskan oleh kemampuan insulin dalam mengaktifkan jalur proliferasi seperti MAPK dan PI3K, serta kemungkinan interaksi dengan jalur IGF-1 yang membantu mempertahankan stemness (Al Madhoun et al., 2021; Moniem et al., 2019). Suplementasi insulin tampaknya menciptakan lingkungan yang lebih seimbang bagi DPSCs, mendukung proliferasi tanpa kehilangan identitas sel punca. Temuan ini menekankan pentingnya penyesuaian kondisi kultur yang cermat dalam mempertahankan karakteristik yang diinginkan dari DPSCs, serta menunjukkan bahwa suplementasi insulin dalam media non serum dapat menjadi pendekatan menjanjikan untuk mengoptimalkan kultur DPSCs untuk berbagai aplikasi di bidang kedokteran regeneratif dan rekayasa jaringan.



Gambar 2. Analisis immunophenotyping dari DPSCs pasca proses perbanyakan. Analisis statistik dilakukan menggunakan one-way ANOVA yang diikuti dengan uji Dunnett untuk menentukan perbedaan signifikan terhadap medium serum berbasis 10% FBS. Tingkat signifikansi statistik ditentukan sebagai * $p \leq 0,01$ dan **** $p \leq 0,0001$.

3.3. Sekresi Sekretom Imunomodulator Terapeutik Meningkat pada Media Non Serum dengan Insulin

Kondisi kultur sangat memengaruhi profil sekresi DPSCs, terutama pada sitokin dan faktor imunomodulator lainnya. Studi terbaru menunjukkan bahwa DPSCs yang dikultur dalam media non serum mengalami penurunan signifikan dalam sekresi faktor imunomodulator, yang berpotensi membatasi aplikasi terapeutik sekretom dalam terapi berbasis imunomodulasi (Liu et al., 2024). Namun, penambahan insulin ke media non serum menunjukkan efektivitas yang tidak hanya untuk mengembalikan, tetapi juga meningkatkan sekresi faktor-faktor penting ini di atas level yang diamati pada media pembandingan berbasis serum dengan 10% FBS (Gambar 3).



Gambar 3. Kuantifikasi terapeutik secretome yang berperan dalam imunomodulasi.

Peningkatan produksi sekretom yang dimediasi oleh insulin dapat diperantarai oleh beberapa mekanisme. Insulin memiliki kemampuan untuk mengaktifkan jalur pensinyalan seperti PI3K/Akt dan MAPK yang terlibat dalam kelangsungan hidup sel, proliferasi, dan sintesis protein (Bhandi et al., 2021; Bousnaki et al., 2022; Dou et al., 2017). Selain itu, insulin terbukti meningkatkan ekspresi gen

yang terkait dengan produksi dan sekresi faktor pertumbuhan pada sel punca mesenkimal (Lee et al., 2022; Liu et al., 2024; Wang et al., 2024; Younes et al., 2023). Profil sekresi yang lebih baik dengan suplementasi insulin kemungkinan juga disebabkan oleh kemampuannya meniru beberapa faktor pertumbuhan yang ada dalam serum, sehingga menciptakan lingkungan yang lebih mendukung fungsi DPSCs tanpa variabilitas yang terkait dengan FBS (Tabel 1)

Tabel 1. Gambaran umum perbandingan efek formulasi media kultur terhadap performa ekspansi DPSCs

Formulasi media	Karakterisasi MSC	Stemness / multipotensi	Kemampuan proliferasi
Media berbasis serum αMEM + 10% FBS	Buruk	Menurun	Tinggi
Media berbasis serum (SF) αMEM + 20 ng/mL FGF2, 10 ng/mL EGF, dan 10 ng/mL PDGF	Baik	Stabil	Rendah
Media berbasis serum + Insulin (SF+Ins) αMEM + 20 ng/mL FGF2, 10 ng/mL EGF, 10 ng/mL PDGF, 10 µg/mL insulin.	Baik	Stabil	Tinggi

4. Kesimpulan

Suplementasi insulin dalam media non serum menawarkan konsep yang menjanjikan untuk meningkatkan produksi DPSCs dan mengoptimalkan produk sekresinya untuk aplikasi terapeutik. Metode ini mengatasi tantangan utama dalam kultur non serum DPSCs dalam proses biomanufaktur terstandar dengan skala yang lebih besar, efisien, dan relevan secara klinis. Peningkatan kualitas kultur dapat dilakukan dengan penelitian lebih lanjut dalam karakterisasi komposisi dan properti fungsional sekretom yang dihasilkan serta mengoptimalkan konsentrasi insulin untuk manfaat maksimal. Seiring dengan perkembangan penelitian di bidang sel punca, metode kultur yang telah disempurnakan ini dapat berperan penting dalam kemajuan kedokteran regeneratif dan mempercepat penerapan terapi berbasis DPSCs dalam aplikasi klinis.

5. Ucapan terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Edward Johansson dan Dr. Stephanie Jordan (UCLA School of Dentistry) atas saran dan diskusi terkait isolasi DPSCs dan aklimatisasi in vitro DPSCs serta profil sekretom berbasis FACS. Kami juga berterima kasih kepada Dr. Yuuka Mitsuhashi (Tokyo Medical and Dental University) atas diskusi dan arahan mengenai protokol optimasi media untuk proliferasi DPSCs.

Daftar Pustaka

- Al Madhoun, A., Sindhu, S., Haddad, D., Atari, M., Ahmad, R., & Al-Mulla, F. (2021). Dental Pulp Stem Cells Derived From Adult Human Third Molar Tooth: A Brief Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(October), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.717624>
- Bendall, S. C., Stewart, M. H., Menendez, P., George, D., Vijayaragavan, K., Werbowetski-Ogilvie, T., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Yang, J., Bossé, M., Lajoie, G., & Bhatia, M. (2007). IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature*, 448(7157), 1015–1021. <https://doi.org/10.1038/nature06027>
- Bhandi, S., Al Khatani, A., Abdulaziz Sumayli, H., Yahya Sabyei, M., Mohammed Al Zailai, A., Ali Sumayli, M., Ibrahim Hakami, H., Abdurabu Jafer, M., Vyas, N., Ali Baeshen, H., Testarelli, L., & Patil, S. (2021). Comparative analysis of cytokines and growth factors in the conditioned media of stem cells from the pulp of deciduous, young, and old permanent tooth. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(6), 3559–3565. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.031>

- Bousnaki, M., Bakopoulou, A., Pich, A., Papachristou, E., Kritis, A., & Koidis, P. (2022). Mapping the Secretome of Dental Pulp Stem Cells Under Variable Microenvironmental Conditions. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(4), 1372–1407. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10255-2>
- de Almeida Fuzeta, M., Bernardes, N., Oliveira, F. D., Costa, A. C., Fernandes-Platzgummer, A., Farinha, J. P., Rodrigues, C. A. V., Jung, S., Tseng, R. J., Milligan, W., Lee, B., Castanho, M. A. R. B., Gaspar, D., Cabral, J. M. S., & da Silva, C. L. (2020). Scalable Production of Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Under Serum-/Xeno-Free Conditions in a Microcarrier-Based Bioreactor Culture System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(November). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.553444>
- Dou, L., Wu, Y., Yan, Q., Wang, J., Zhang, Y., & Ji, P. (2017). Secretome profiles of immortalized dental follicle cells using iTRAQ-based proteomic analysis /631/114/2784 /631/337/475 /82 /82/58 /13/100 article. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07467-3>
- Lee, J. Y., Kang, M. H., Jang, J. E., Lee, J. E., Yang, Y., Choi, J. Y., Kang, H. S., Lee, U., Choung, J. W., Jung, H., Yoon, Y. C., Jung, K. H., Hong, S. -S, Yi, E. C., & Park, S. G. (2022). Comparative analysis of mesenchymal stem cells cultivated in serum free media. *Scientific Reports*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12467-z>
- Liu, T., Ma, Z., Liu, L., Pei, Y., Wu, Q., Xu, S., Liu, Y., Ding, N., Guan, Y., Zhang, Y., & Chen, X. (2024). Conditioned medium from human dental pulp stem cells treats spinal cord injury by inhibiting microglial pyroptosis. *Neural Regeneration Research*, 19(5), 1105–1111. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.385309>
- Moniem, E. M. A., EL-Batran, M. M., Halawa, A. M., Gomaa, D. H., Eldeen, G. N., & Aly, R. M. (2019). Optimizing a serum-free/xeno-free culture medium for culturing and promoting the proliferation of human dental pulp stem cells. *Stem Cell Investigation*, 6, 2–11. <https://doi.org/10.21037/sci.2019.06.05>
- Pachler, K., Lener, T., Streif, D., Dunai, Z. A., Desgeorges, A., Feichtner, M., Öller, M., Schallmoser, K., Rohde, E., & Gimona, M. (2017). A Good Manufacturing Practice–grade standard protocol for exclusively human mesenchymal stromal cell–derived extracellular vesicles. *Cytotherapy*, 19(4), 458–472. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.01.001>
- Ren, H., Sang, Y., Zhang, F., Liu, Z., Qi, N., & Chen, Y. (2016). Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord, Dental Pulp, and Menstrual Blood as Sources for Cell Therapy. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3516574>
- Torizal, F. G., Kerans, F. A. K., & Khumaira, A. (2022). Production of mesenchymal stem cell derived-secretome as cell-free regenerative therapy and immunomodulation: A biomanufacturing perspective. *BIOCELL*. <https://doi.org/10.32604/biocell.2022.019591>
- Torizal, F. G., Lau, Q. Y., Ibuki, M., Kawai, Y., Horikawa, M., Minami, M., Michiue, T., Horiguchi, I., Nishikawa, M., & Sakai, Y. (2021). A miniature dialysis-culture device allows high-density human-induced pluripotent stem cells expansion from growth factor accumulation. *Communications Biology*, 4(1316), 1316. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02848-x>
- Torizal, F. G., Noorintan, S. T., & Gania, Z. (2024). Bioengineering Tooth and Periodontal Organoids from Stem and Progenitor Cells. *Organoids*, 247–265.
- Wang, X., Li, F., Wu, S., Xing, W., Fu, J., Wang, R., & He, Y. (2024). Research progress on optimization of in vitro isolation, cultivation and preservation methods of dental pulp stem cells for clinical application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12(April). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1305614>
- Younes, R., Issa, Y., Jdaa, N., Chouaib, B., Brugiotti, V., Challuau, D., Raoul, C., Scamps, F., Cuisinier, F., & Hilaire, C. (2023). The Secretome of Human Dental Pulp Stem Cells and Its Components GDF15 and HB-EGF Protect Amyotrophic Lateral Sclerosis Motoneurons against Death. *Biomedicines*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082152>
- Zhou, L., Zhao, S., & Xing, X. (2023). Effects of different signaling pathways on odontogenic differentiation of dental pulp stem cells: a review. *Frontiers in Physiology*, 14(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1272764>