

Produksi Parthenogenetik Blastosis Mencit Sebagai Sumber *Stem Cell*

Ratih Rinendyaputri, Uly Alfi Nikmah

¹Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kemenkes RI
email: ratih79@yahoo.com

Abstract

Embryonic Stem Cells (ESCs) is a one of source for pluripotent stem cell that capable to differentiate into various cell types. This has opened up opportunities utilization of embryos as a source of stem cells. However, the use of embryos as objects of research still has ethical constraints. Currently parthenogenetic embryo in the blastocyst stage is considered to be one of the alternative sources of ESC are "ethical" because its obtained not from the fertilization of the oocyte and sperm. Parthenogenetic embryo derived from oocyte that activation in vitro to obtain embryos in the blastocyst stage. This research aims to produce blastocysts parthenogenetic mice as a source of ESC. In this study super ovulation performed on Swiss Webster female mice to obtain oocytes. Activation of mouse oocytes done by culturing oocytes in medium with 10 mM strontium chloride (SrCl₂) and 5 mg / ml cytokalasin B for 6 hours and cultured for 4-5 days to get the embryo parthenogenetic. The results showed that development of mice oocyte activated to be 2 pronucleus (2PN), cleavage, morula and blastocyst sequence was 65%, 97%, 90% and 23%. The conclusion of this study indicate that the parthenogenetic embryos as sources of stem cells can be produced in vitro.

Keywords: stem cells, embryonic stem cells (ESCs), blastocyst, parthenogenetic

Abstrak

Embryonic Stem Cells (ESCs) merupakan salah satu sumber sel punca (*stem cell*) yang bersifat pluripoten karena kemampuannya berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel. Hal inilah yang membuka peluang pemanfaatan embrio sebagai sumber stem cell. Namun pemanfaatan embrio sebagai objek penelitian masih mempunyai kendala etik. Saat ini embrio partenogenetik tahap blastosis dianggap dapat menjadi salah satu alternatif sumber ESC yang "etis" karena diperoleh bukan dari hasil fertilisasi antara oosit dan sperma. Embrio parthenogenetik diperoleh dari aktivasi oosit secara *in vitro* untuk memperoleh embrio tahap blastosis. Penelitian ini bertujuan memproduksi blastosis partenogenetik mencit sebagai sumber ESC. Pada penelitian ini superovulasi dilakukan pada mencit betina Swis webster untuk mendapatkan oosit. Aktivasi oosit mencit dilakukan dengan mengkultur oosit dalam medium dengan 10mM *strontium chloride* (SrCl₂) dan 5 µg/ml *cytokalasin B* selama 6 jam dan kultur selama 4-5 hari untuk mendapatkan embrio partenogenetik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perkembangan oosit mencit yang telah teraktivasi menjadi tahap 2 pronukleus (2PN), *cleavage*, morula dan blastosis secara berurutan adalah 65%, 97%, 90% dan 23%. Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan bahwa embrio partenogenetik sebagai sumber *stem cell* dapat diproduksi secara *in vitro*.

Kata kunci: Sel punca (*stem cell*), sel punca embrionik (ESCs), blastosis, partenogenetik

Pendahuluan

Embryonic Stem Cells (ESCs) merupakan sumber sel punca (*stem cell*) yang bersifat pluripotensi. Hal ini mempunyai potensi yang sangat besar untuk dapat dimanfaatkan sebagai terapi sel, tetapi sampai saat ini penelitian dan aplikasi ESCs sebagai sumber sel punca masih terkendala dari aspek etika. Berbagai teknik kultur dan molekuler dilakukan untuk mendapatkan embrio “etis” yang mempunyai sifat pluripoten dan tidak bertentangan dengan etik. Embrio parthenogenetik dianggap dapat menjadi salah satu embrio “etis” karena tidak mampu hidup menjadi individu pada mamalia. Hal ini disebabkan adanya kerusakan perkembangan plasenta dan *genomic imprinting*.¹ Ketidakmampuan embrio parthenogenetik menjadi sumber kloning reproduksi memberikan peluang yang besar sebagai sumber kloning terapi.²

Embrio parthenogenetik dianggap sebagai salah satu embrio “etis” karena bukan merupakan hasil fertilisasi dan tidak dapat berkembang sempurna sehingga tidak dapat bertahan hidup karena kegagalan pada proses implantasi seperti embrio hasil fertilisasi. Embrio parthenogenetik dihasilkan dari sel telur yang diaktivasi dan berkembang menjadi embrio dengan genom diploid tanpa kehadiran spermatozoa.³ Aktivasi sel telur dapat dilakukan dengan menggunakan bahan kimia atau kejutan listrik. Embrio parthenogenetika akan berkembang sampai tahap blastosis seperti embrio normal. Bagian *inner cell mass* (ICM) yang akan berkembang menjadi fetus dijadikan sumber *ESC line*. ICM dapat berkembang biak dalam media kultur optimal menjadi berbagai tipe sel tubuh dari 3 lapisan germinal (entoderm, mesoderm dan ektoderm).^{2,3} Selain memecahkan masalah etik, embrio parthenogenetik sebagai sumber ESC yang akan dimanfaatkan sebagai terapi mampu menghindari penolakan imun, hal ini dapat terjadi karena blastosis partheno-genetik

mempunyai satu set MHC sehingga dapat meminimalisasi variasi ketidakcocokan MHC atau HLA. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi blastosis parthenogenetik mencit yang dapat menjadi sumber ESC.

Metode

Hewan Percobaan

Superovulasi, Isolasi Sel Telur dan Embrio Blastosis

Superovulasi mencit dilakukan dengan injeksi intraperitoneal 5 IU *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG) diikuti 48 jam kemudian dengan injeksi 5 IU *human chorionic gonadotropin* (hCG). Koleksi oosit dilakukan pada 17 jam setelah penyuntikan hCG, dengan cara menyayat dinding ampula menggunakan ujung jarum suntik. Sel telur yang dikoleksi ditempatkan dalam *modified phosphate buffer saline* (mPBS) yang mengandung 0.03% hyaluro-nidase untuk melepaskan ikatan antara sel-sel kumulus kemudian dimasukkan dalam medium aktivasi.^{4,5}

Untuk mendapatkan embrio tahap blastosis setelah penyuntikan hCG mencit betina dikawinkan dengan mencampur mencit jantan. Keesokan harinya dilihat ada tidaknya *vagina plug*, mencit betina dimatikan secara *dislocatio cervicalis* setelah 90 jam pemberian hCG.⁶ Isolasi dilakukan dengan flushing uterus dengan spuit 1 ml dan medium mPBS 10% *fetal bovine serum* (FBS) di bawah mikroskop stereo.

Aktivasi Partenogenesis dan Diploidisasi

Oosit yang sudah matang (terdapat *polar body I*) dipaparkan dalam larutan *strontium chloride* (SrCl₂) 10mM dan 5 µg/ml *cytokalasin B* (CB) selama enam jam di inkubator suhu 37⁰ C dengan 5% CO₂ untuk menghasilkan diploidisasi.⁴

Kultur Sel Telur dengan 2PN sampai Embrio Tahap Blastosis

Oosit yang teraktivasi yang ditandai oleh terbentuknya dua pronukleus (2PN) selanjutnya dikultur dalam medium *potassium simplex optimization medium* (KSOM) atau Chatot, Ziomek, and Bavister (CZB) yang disuplementasi dengan 50 µg/ml penicillin, 50 unit/ml streptomycin, 0,4% bovine serum albumin (BSA). Hari ke dua kultur embrio yang sudah mencapai tahap 2 atau 4 sel dipindahkan ke medium kultur KSOM 20% FBS dan penambahan glukosa. Kultur dilakukan di bawah mineral oil, pada 5% CO₂, 37°C.⁷

Hasil

Tingkat superovulasi (Tabel.1) menunjukkan respon superovulasi mencit betina strain Swis webster terhadap hormon PMSG dan hCG yaitu 12 oosit per ekor. Sedangkan pada induk mencit dengan siklus alami (tanpa superovulasi) mencapai 10-12 ekor fetus yang terlahir. Hal ini terjadi karena beberapa faktor yang dapat mempengaruhi respon terhadap hormon dalam proses superovulasi selain umur, strain dan dosis hormon yang diberikan. Mencit mempunyai empat siklus yaitu estrus, matestrus, diestrus dan proestrus. Tetapi perbedaan pemberian hormon pada keempat siklus estrus tidak menunjukkan perbedaan respon yang nyata.⁷

Tabel 1.
Tingkat Superovulasi dan Perkembangan Oosit Mencit Setelah Diaktivasi SrCl₂ dan CB

	Aktivasi SrCl ₂ + CB	
Mencit (n)	25	%
Oosit (n)	319	(319/25) 12,76%
2 PN	206	(206/319) 65%
Cleavage rate	199	(199/206) 97%
Morula	185	(185/206) 90%
Blastosis	47	(47/206) 23%

Oosit hasil superovulasi didapatkan sebagian besar dalam tahap metafase II (Gambar 1). Pada tahap ini oosit telah matang dan siap mengalami pembuahan. Maturasi (tingkat kematangan) oosit meliputi maturasi inti dan sitoplasma. Proses perkembangan oosit berikutnya terjadi oleh penetrasi spermatozoa. Penetrasi spermatozoa akan merangsang sel telur untuk menyelesaikan proses meiosis II yang menghasilkan 3 badan polar dan satu pronukleus betina. Masuknya spermatozoa dalam ooplasma menyebabkan reorganisasi penyebaran protein di dalam ooplasma.⁸

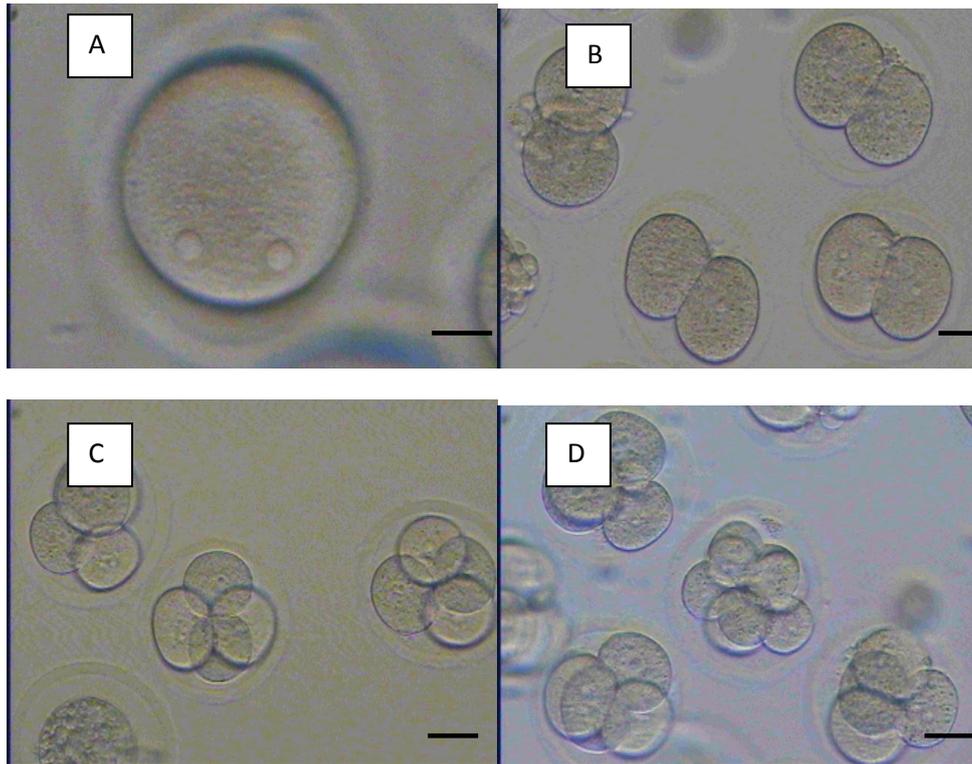


Gambar 1. Oosit Mencit yang Telah Mature Ditandai dengan Polar Body (PB). Bar : 50µm.

Pada embrio parthenogenetik aktivasi oosit dengan menggunakan stimulasi listrik atau bahan kimia seperti etanol, stronsium dan 6-dimethylamino purin (DMAP) dapat merangsang oosit sekunder (n) menyelesaikan proses meiosis II.^{4,9} Pada tikus dan mencit penggunaan *stronsium chloride* ($SrCl_2$) merupakan bahan aktivasi parthenogenetik yang paling efektif pada setiap tingkat pematangan oosit.¹⁰ Pada penelitian ini menunjukkan tingkat perkembangan oosit yang telah diaktivasi menggunakan $SrCl_2$ dan CB dengan tingkat aktivasi 65%. *Ceavage rate* dari oosit yang telah teraktivasi dengan menunjukkan adanya 2

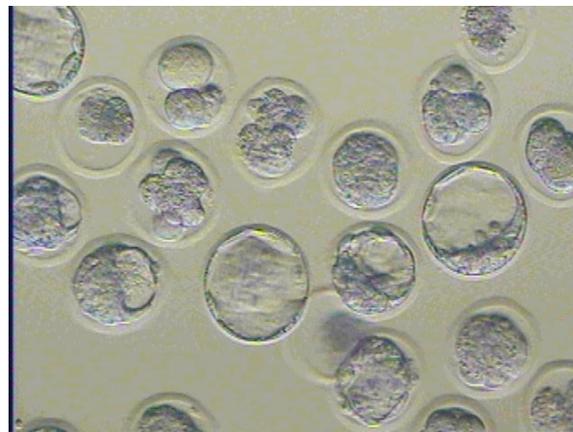
PN menjadi 2 atau 4 sel setelah 24 jam kultur menunjukkan persentase yang tinggi yaitu 97% (Tabel 1) lebih tinggi dibandingkan *cleavage rate* oosit kelinci yang diaktivasi menggunakan listrik, bahan kimia dan fertilisasi *in vivo* masing-masing sebesar 81.1%, 86.75 dan 98.5%.⁹ Pada oosit sapi *cleavage rate* 88% yang diaktivasi dengan phospolipase czeta.¹⁰ Tingginya *cleavage rate* pada aktivasi oosit mencit menggunakan $SrCl_2$ pada penelitian ini terjadi karena peningkatan kalsium intraseluler yang disebabkan oleh $SrCl_2$ bergelombang seperti aktivasi dari sperma terhadap oosit.⁴

Pada proses aktivasi selain digunakan $SrCl_2$ penggunaan CB berfungsi sebagai penghambat kariokinesis. Kariokinensis merupakan proses miosis II menghasilkan badan polar II (n). Penambahan aktivator seperti cythocalasin B dan DMAP akan menginduksi diploidisasi sehingga proses sitokinensis dihambat. Bagian dari sel yang berperan dalam pembelahan sel (sitokinesis) adalah sitoskeleton. Sitoskeleton terdiri dari mikrotubuler, mikrofilamen dan filamen intermediet. Cythocalasin B (CB) berfungsi menghambat sitokinesis tanpa menghambat terjadinya kariokinesis dengan menghambat bagian *plus end* dari mikrofilamen.¹⁰ Cythocalasin B akan menghambat transport deoxyglukosa serta mampu berinkorporasi dengan glukosa, glukosamin dan ekstraseluler prekusur pada makromolekul beberapa tipe sel. Efek dari ikatan CB dipermukaan dengan membran sel mengakibatkan transport substansi yang penting dari dalam maupun dari luar sel akan terhambat.¹¹ Interaksi CB dengan plasma membran mempengaruhi proses pada membran atau struktur mikrofilamen.



A: Sel Telur yang Telah Teraktivasi (2 PN), B: Embrio Tahap 2 Sel, C: Embrio Tahap 4 Sel, D: embrio Tahap 8 Sel.

Gambar 2. Perkembangan Embrio Parthenogenetik.



Gambar 3. Embrio Parthenogenetik Tahap Blastosis. Bar : 50 μ m

Pembahasan

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi respon terhadap produksi hormon saat proses superovulasi selain umur, strain, dosis hormon yang diberikan adalah siklus estrus mencit pada saat pemberian hormon. Mencit mempunyai empat siklus yaitu estrus, matestrus, diestrus dan proestrus. Tetapi perbedaan pemberian hormon pada keempat siklus estrus tidak menunjukkan perbedaan respon yang nyata.⁷ Proses perkembangan oosit berikutnya terjadi oleh penetrasi spermatozoa. Penetrasi spermatozoa akan merangsang oosit untuk menyelesaikan proses meiosis II yang menghasilkan 3 badan polar dan satu pronukleus betina. Masuknya spermatozoa dalam ooplasma menyebabkan reorganisasi penyebaran protein di dalam ooplasma.⁹

Pada embrio parthenogenetik aktivasi oosit dengan menggunakan stimulasi listrik atau bahan kimia seperti etanol, stronsium dan 6-dimethylamino purin (DMAP) dapat merangsang oosit sekunder (n) menyelesaikan proses meiosis II.^{4,10} Pada tikus dan mencit penggunaan *stronsium chloride* ($SrCl_2$) merupakan bahan aktivasi partenogenetik yang paling efektif pada setiap tingkat pematangan oosit.⁸ Penelitian ini menunjukkan tingkat perkembangan oosit yang telah diaktivasi menggunakan $SrCl_2$ dan CB dengan tingkat aktivasi 65%. *Cleavage rate* dari oosit yang telah teraktivasi dengan menunjukkan adanya 2 PN menjadi 2 atau 4 sel setelah 24 jam kultur menunjukkan persentase yang tinggi yaitu 97% (Tabel 1) lebih tinggi dibandingkan *cleavage rate* oosit kelinci yang diaktivasi menggunakan listrik, bahan kimia dan fertilisasi *in vivo* masing-masing sebesar 81.1%, 86.75 dan 98.5%.⁹ Pada oosit sapi *cleavage rate* 88% yang diaktivasi dengan fosfolipase ζ .¹⁰ Tingginya *cleavage rate* pada aktivasi oosit mencit menggunakan $SrCl_2$ pada penelitian ini terjadi karena peningkatan kalsium intraseluler yang

disebabkan oleh $SrCl_2$ bergelombang seperti aktivasi dari sperma terhadap oosit.⁴

Pada proses aktivasi selain digunakan $SrCl_2$ penggunaan CB berfungsi sebagai penghambat kariokinesis. Kariokinesis merupakan proses meiosis II menghasilkan badan polar II (n). Penambahan aktivator seperti *cythocalasin B* dan DMAP akan menginduksi diploidisasi dimana proses sitokinesis dihambat. Bagian dari sel yang berperan dalam pembelahan sel (sitokinesis) adalah sitoskeleton. Sitoskeleton terdiri dari mikrotubuler, mikrofilamen dan filamen intermediet. *Cythocalasin B* (CB) berfungsi menghambat sitokinesis tanpa menghambat terjadinya kariokinesis dengan menghambat bagian *plus end* dari mikrofilamen.¹⁰ *Cythocalasin B* akan menghambat transport deoxyglukosa serta mampu berinkorporasi dengan glukosa, glukosamin dan ekstraseluler prekursor pada makromolekul beberapa tipe sel. Efek dari ikatan CB dipermukaan dengan membran sel mengakibatkan transport substansi yang penting dari dalam maupun dari luar sel akan terhambat.¹¹ Interaksi CB dengan plasma membran mempengaruhi proses pada membran atau struktur mikrofilamen.

Perkembangan embrio dari tahap 2PN, 2 sel, 4 sel, 8 sel sampai dengan tahap blastosis dapat diamati secara *in vitro* (Gambar 2 dan 3). Keberhasilan aktivasi sel telur sangat bergantung pada tingkat kematangan oosit. Tingkat kematangan baik kematangan inti dan sitoplasma oosit dipengaruhi oleh *maturation promoting factor* (MPF) dan *mitogen activating protein kinase*.³ Menurut Roh dkk.⁸ perkembangan embrio parthenogenetik secara *in vitro* sangat tergantung pada faktor autokrin atau parakrin yang dipengaruhi oleh kondisi lingkungan yaitu kepadatan embrio dengan volume medium kultur. Penambahan kalsium pada medium kultur akan meningkatkan influk kalsium yang berperan dalam mendukung

keberhasilan aktivasi parthenogenetik.^{12,13} Kondisi sub kultur secara *in vitro* juga meningkatkan apoptosis embrio parthenogenetik.¹⁴

Tingkat perkembangan embrio mencit menjadi morula dan blastosis dari oosit yang teraktivasi masing-masing secara berurutan 90% dan 23% (Tabel 2) hasil ini menunjukkan tingkat perkembangan yang lebih rendah dibandingkan dengan perkembangan tahap morula dan blastosis kelinci yaitu 50% dan 35%.⁹ Perkembangan embrio dari tahap 2PN menjadi tahap 2 sel sampai dengan tahap blastosis secara *in vitro* sangat dipengaruhi oleh kondisi medium kultur, kelembaban dan pH. Kondisi kultur *in vitro* dikondisikan menyerupai kondisi *in vivo* seperti pH 7.4, penggunaan buffer bikarbonat dengan gas CO₂ 5%, suhu 37°C merupakan sistem yang diciptakan sesuai fisiologi darah. Penggunaan mineral oil diberikan untuk mengurangi penguapan medium kultur yang dapat mengubah keasaman medium kultur.^{8,9} Air yang digunakan dalam melarutkan media adalah air yang telah dipurifikasi dan difilter sehingga terbebas dari zat maupun bakteri yang dapat bersifat toksik bagi embrio. Protein, serum, garam atau mineral dan sumber energi seperti glukosa, laktat dan piruvat adalah substrat yang penting bagi untuk perkembangan embrio dan ditambahkan dalam medium kultur.^{10,11} Piruvat dan laktat merupakan sumber energi yang baik untuk perkembangan awal embrio dimana terjadi *cleavage*. Glukosa diberikan pada medium kultur untuk perkembangan embrio dari tahap 4 sel sampai blastosis karena metabolisme glukosa dapat memblok proses *cleavage*.¹² Glutamin merupakan asam amino yang digunakan dalam medium kultur memberikan efek positif terhadap perkembangan embrio, beberapa asam amino tidak stabil dalam suhu 37°C sehingga akumulasi ion amonium dalam konsentrasi yang tinggi mengakibatkan kondisi yang toksik bagi embrio.¹³ Kondisi

kultur yang tidak optimal menyebabkan berhentinya perkembangan embrio.⁷

Beberapa hal yang dijadikan pertimbangan dalam pemanfaatan embrio parthenogenetik dibandingkan dengan iPS dan *somatic cell nuclear transfer* (SCNT). Menurut Hao dkk.² dua hal penting yang menjadi tantangan sebelum aplikasi klinik penggunaan terapi sel, yaitu penolakan imunitas pasien terhadap ESC dan kurangnya kemampuan sel yang ditransplantasikan menggantikan sel yang rusak. ESC parthenogenetik hanya mengandung satu set *major histocompatibility complex* (MHC) yang kemudian diduplikasikan selama pembentukan embrionik. Gen MHC terletak pada lokus kromosom autosomal ke 6, sehingga pada embrio parthenogenetik kromosom autosomal hanya didapat dari kromosom sel telur.¹⁴ Sel punca yang mengandung sedikit kombinasi MHC memiliki tingkat imunogenitas yang lebih rendah sehingga lebih mudah diterima oleh berbagai tipe jaringan pasien.¹⁵ Hal ini sangat diharapkan apabila ditransplantasikan ke tubuh pasien dalam terapan medis yang akan meminimalkan atau bahkan menghilangkan respon penolakan sistem imun tubuh terhadap benda yang dianggap asing. Strategi yang penting pada transplantasi sel adalah mengatasi penolakan imunitas dengan terapi sel yang mempunyai kecocokan MHC, sehingga ESC parthenogenetik dapat menjadi alternatif yang tepat.¹³

Kesimpulan

Pada penelitian ini dapat diproduksi embrio parthenogenetik sampai pada tahap blastosis mencapai 23% secara *in vitro* sebagai sumber ESC. Perlu dilakukan isolasi dan kultur ICM dari blastosis parthenogenetik sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber terapi sel maupun sel dignostik.

Saran

Perlu dilakukan isolasi dan kultur ICM dari blastosis parthenogenetik sebagai sumber *embryonic stem cell* (ESC).

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Prof. Arief Boediono, DVM, PhD, Dr. Thomas Mata Hine, Drs. Cornelis Adi Munca, teman-teman di Laboratorium Hewan Coba dan Laboratorium Stem Cell Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (PBTDK), Kepala Pusat PBTDK Balitbangkes yang telah memberikan dana untuk penelitian ini, bimbingan dan arahan dalam melaksanakan penelitian, serta membantu kelancaran penelitian ini.

Daftar Rujukan

1. Allen ND, Barton SC, Hilton K, Norris ML and Surani MA. A functional analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells. *Development* 1994; 120: 1473-82.
2. Hao J, WanWan Z, Chao S, Yang Y, Qi Z. Human parthenogenetic embryonic stem cells: one potential resource for cell therapy. *Science in China Series C: Life Sciences* 2009; 243-51.
3. Revazova ES, Turovets NA, Kochetkova OD, Kindarov LB, Kuzmicev LN, Janus JD and Pryzhkov MV. Patient-specific stem cell line derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning and stem cell* 2007; 9 (3): 432-49.
4. Imahie H, Takahashi M, Toyoda Y, sato E. Differential effects of cytochalasin B on cytokinesis in parthenogenetically activated mouse oocyte. *J Reprod Dev* 2002; 48: 31-40.
5. Lin H, Lei J, Wininger D, Nguyen M-T, Khanna R, Hartmann C, Yan W-L, Huang SC. Multilineage potential of homozygous stem cells derived from metaphase II oocytes. *Stem Cells* . 2003; 21: 152-61.
6. Pedro PB, Yokoyama E, Zhu SE, Yoshida, Valdez DM, Tanaka M, Edashige K and Kasai M. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stage to five cryoprotectans. *J Reprrod Dev* 2005; 51:235-46.
7. Roh Sangho, Choi Young-Joo and Min Byung Moo. Optimization of Embryo Density an the volume of culture medium for an improvement of mause parthnogenetic embryo development. *Reprod Dev Biol* 2005; 29 (3): 145-47.
8. Wang S, Tang X, Niu Y, Chen H, Li B, Li T, Zhang X, Hu Z,Zhou Q and Ji W. Generation and caharacterization of rabbit embryonic stem cell. *Stem cell* 2007; 25: 481-9.
9. Ros PJ, Beyhan Z, Lagu AE, Yoon SY, Malcuit C, Schellander K, Fissore RA and Cibelli JB. *BMC Developmental biology* 2008; 8:16.
10. Ross FEPP, Zang G, Divita A, Cunniff K Denaday F, Salamone D, Kiessling Ann and Cieblli J. Human parthenogenetic blastocysts derived from noninseminated cryopreserved human oocytes. *Fertility and Sterility* 2008; 89 (4): 230-40.
11. Hua WW, Machaity Z, Abeydeera LR, Prather RS and Day BN. Parthenogenetic Activation of Pig Oocytes with Calcium Ionophore and the Block to Sperm Penetration after Activation. *Biology of reproduction* 1998; 58 : 1357-66.
12. Yanhong H, Liangxue L, Mao IJ, Sun G, Bonk A, and Prather RS. Apoptosis in Parthenogenetic Preimplantation Porcine Embryos. *Biology of reproduction* 2004; 3: 267-77.
13. Qiong W, Kumagi T, Kawahara M, Ogawa H, Hiura H, Obata Y, Takana R and Kono T. Regulated expression of two sets of paternally imprinted genes is necessary for mouse parthenogenetic development to term. *Reproduction* 2006; 131 : 481-88.
14. Kim K *et al.* Histocompatible embryonic stem cells by parthenogenesis. *Science* 2007; 315:482-486.