



Clinical applications of adipose-derived stem cells and aspects related with good manufacturing practices

Title in Spanish: *Aplicaciones clínicas de células madres derivadas de tejido adiposo y aspectos relacionados con buenas prácticas de manufactura*

Katherine Fabiola Rodríguez Cid¹, Patricia Soledad Carreño González^{1,2}, Fernando Antonio Albornoz Márquez³, Soledad de los Ángeles Herrera Jofré³, Caroline Ruth Weinstein-Oppenheimer*^{1,2}

¹Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso. ²Centro de Investigación Farmacopea Chilena, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile. ³Inbiocriotec S.A., Viña del Mar, Chile.

ABSTRACT: Currently, cell therapy through the clinical use of stem cells (SC) has acquired relevance as a treatment for diseases involving tissue or organ repair, in which the organism is not able to properly respond. An area of recent interest is focused on the use of adipose-derived stem cells (ASCs) that exhibit advantages in comparison to the bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC-BM), which have been widely investigated. Multiple studies focused on the clinical applications of this type of cells have been promising and satisfying, which allowed their recent approval by the European Medicines Agency (EMA) for the treatment of complex fistulas in Crohn's disease. In consequence, as for any human use medicine, they require a system of standards that regulate their production, as the good manufacturing practices (GMP), whose aim is to assure the efficacy and safety for the patients. This review addresses relevant aspects related to the advantages, clinical applications and standards that regulate ASCs production.

RESUMEN: En la actualidad la terapia celular, a través de las aplicaciones clínicas de las células madre (stem cell, SC), ha adquirido importancia como tratamiento para enfermedades que involucran la reparación de tejidos u órganos, frente a las cuales el organismo no es capaz de responder adecuadamente. Un campo de reciente interés se centra en el uso de células madre derivadas de adipocitos (adipose-derived stem cells, ASCs), que presentan ventajas en comparación a las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (mesenchymal stem cells derived from bone marrow, MSC-BM), las que han sido ampliamente investigadas. Los múltiples estudios enfocados en las aplicaciones clínicas de este tipo celular han sido muy prometedores y satisfactorios, lo que ha permitido que recientemente hayan sido aprobadas por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para el tratamiento de fistulas complejas en enfermedad de Crohn. Como consecuencia de lo anterior, al igual que cualquier medicamento de uso humano, requieren de un sistema de normas que regule su producción, como son las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), cuyo objetivo es asegurar la eficacia y seguridad para los pacientes. En esta revisión se abordan aspectos relevantes en relación a las ventajas, aplicaciones clínicas y normas que rigen la producción de ASCs.

*Corresponding Author: caroline.weinstein@uv.cl

Received: January 16, 2018 Accepted: January 20, 2018

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 4 (2017), pp. 392-402

Language of Manuscript: Spanish

1. CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE

Las SC se encuentran en todo tipo de organismos pluricelulares y se caracterizan por tener la capacidad de dividirse dando origen a una célula con sus mismas características, lo que se conoce como autorrenovación y a una célula con la facultad de diferenciarse en otros tipos celulares (1). Estas pueden clasificarse según su estado evolutivo, en embrionarias o adultas (2) y de acuerdo a su capacidad de diferenciación pueden ser totipotentes, como es el caso del cigoto que puede formar a un organismo completo, incluyendo tanto las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) como los tejidos

extraembrionarios (3), luego se encuentran las células madres pluripotentes que pueden dar origen a los tres linajes embrionarios antes mencionados dentro de las que se localizan las células madres embrionarias (3). Por otra parte, están las multipotentes que generan solo células de su mismo linaje embrionario, como las células madres mesenquimales (MSCs) y las hematopoyéticas, y por último, están las células madres unipotentes que pueden diferenciarse solo en un tipo celular, como las células madres musculares (2,3). Sin embargo, cabe mencionar otro tipo de células madres que son conocidas como células madres pluripotentes inducidas (iPS) (3) que

corresponden a células somáticas reprogramadas mediante la introducción de factores de transcripción como Oct4 y Sox2 en vectores retrovirales, para convertirlas en células similares a las embrionarias, con las que comparten la expresión de algunos marcadores (SSEA-3, SSEA-4, antígeno relacionado con tumores TRA-1-60, entre otros) y la capacidad pluripotente de diferenciación (4). Las primeras iPS de origen murino se registraron en 2006 (5) y las de fibroblastos humanos en 2007 (4).

En la terapia celular se utilizan específicamente las células madre adultas, éstas se encuentran en diferentes tejidos en todo el organismo y de esto dependería su velocidad de división (1). Mientras que la epidermis, el intestino y el sistema hematopoyético tienen una rotación diaria, como parte normal de su proceso de renovación, hay otros tejidos como el músculo esquelético y el cerebro que tienen una rotación mucho más lenta y que se ve activada en situaciones específicas, como una lesión muscular en el caso de las primeras (1,6). La localización específica de las células madre se da en regiones anatómicas que se conocen como nichos, cada uno de estos tiene características únicas que influyen en el control del comportamiento y de la actividad de división y diferenciación de las células madre. Los mecanismos mediante los cuales se regulan estos procesos incluyen estímulos de diferenciación y estímulos apoptóticos, los que están siendo recientemente investigados (1,7).

2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células que más se han utilizado en ensayos clínicos son las MSCs. La International Society for Cellular Therapy (ISCT) ha establecido los criterios mínimos para definir las, con el fin de obtener una caracterización uniforme de éstas y, a su vez, facilitar el intercambio y comparación de la información referente a este tema (8). En primer lugar, las MSC deben tener la capacidad de adherirse al plástico al encontrarse en condiciones estándar de cultivo. Por otra parte, mediante citometría de flujo, se debe comprobar que más del 95% de la población de MSC posee los antígenos de superficie CD105, CD73 y CD90, y que el 98% de la población carece de CD45 (marcador de leucocitos), CD34 (marcador de progenitores hematopoyéticos) CD14 y CD11b (marcadores expresados en monocitos y macrófagos), CD79a y CD19 (marcadores de células B) y además no deben presentar HLA-DR sin previa estimulación, por ejemplo con IFN- γ (8). Por último, la característica que más identifica a las MSC es su propiedad biológica de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos, usando condiciones específicas de cultivo *in vitro* para la diferenciación de cada linaje celular, y que posteriormente se identifican mediante tinciones específicas. Para la diferenciación a osteoblastos se puede utilizar Alizarin red, mientras que la diferenciación a adipocitos puede ser demostrada mediante tinción con Oil Red O y, a su vez, con Azul Alcian para los condroblastos (8,9).

Las MSCs pueden ser obtenidas desde variadas fuentes como tejido adiposo, médula ósea, tejido de cordón

umbilical, pulpa dental, entre otros (2,7,10). En 2001, se propuso al tejido adiposo como una fuente de células con un rendimiento adecuado y que implica un procedimiento de extracción con mínimas molestias y riesgos para el paciente. Para esto, se obtuvo tejido adiposo humano mediante liposucción, el que fue procesado mediante métodos estandarizados, para lo cual se lavó el lipoaspirado con buffer fosfato, luego la matriz extracelular fue digerida con colagenasa tipo I, al 0,075 % durante 30 min a 37°C. La actividad enzimática fue neutralizada con Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), que contenía 10% de suero bovino, y posteriormente se centrifugó obteniendo el pellet de fracción vascular estromal (SVF), que corresponde a una población celular heterogénea que incluye eritrocitos, células endoteliales, pericitos, fibroblastos y preadipocitos (9,11). A su vez, este pellet fue resuspendido en NH₄Cl (160 mM) e incubado a temperatura ambiente durante 10 min, para lisar los eritrocitos remanentes y nuevamente el pellet fue separado por centrifugación, se hizo pasar a través de un filtro de 100 μ m para eliminar residuos celulares y se incubó durante la noche a 37°C/5 % CO₂ en medio de cultivo (DMEM, suero bovino fetal 10 % y solución antibiótica/antimicótica al 1 %). Finalmente, las placas fueron lavadas extensamente con buffer fosfato para eliminar los eritrocitos residuales y se obtuvo una población celular que se caracterizó como células similares a fibroblastos. Para clasificar estas células como MSCs se confirmó su capacidad de diferenciación a linajes adipogénicos, osteogénicos, condrogénicos y miogénicos, utilizando medios de cultivo con factores inductores específicos para inducir la diferenciación a cada linaje celular y además, los resultados fueron comparados con un control positivo correspondiente a MSC-BM (11). Desde entonces la extracción, el aislamiento e identificación de las ASCs ha seguido una metodología muy similar (12,13).

3. COMPARACIÓN DE ASCS FRENTE A MSC-BM

En primer lugar, estos tipos de células madres presentan algunas similitudes a destacar. De acuerdo a lo observado por Zhu, ambas tienen un perfil semejante en cuanto a sus características morfológicas y expresión de marcadores de superficie (14). Del mismo modo, no se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la senescencia de ASCs y MSC-BM, basándose en el ensayo de tinción que detecta la actividad de β -galactosidasa en células senescentes a pH 6,0 (15,16). Por otra parte, se ha establecido que ambas son capaces de diferenciarse a tejidos mesodérmicos y no mesodérmicos (como tejido miogénico, endotelial, hepático, pancreático y neurogénico) (13). Además, con respecto a su diferenciación, algunos investigadores han reportado que presentan un potencial equivalente de diferenciación a adipocitos, cartílagos, huesos y músculo esquelético (16,17). Aunque este tema es controversial, ya que otros autores indican que las ASCs tienen mayor potencial de diferenciación miogénica, y menor potencial de diferenciación condrogénica y osteogénica que las MSC-BM (18). De ser así, estas diferencias debieran ser

aprovechadas para obtener mejores resultados en sus aplicaciones regenerativas.

Sin embargo, pese a sus similitudes, las ASCs presentan ventajas comparativas frente a las MSC-BM. La primera que se distingue se relaciona con la recolección de MSC-BM, que se realiza mediante una aspiración de médula ósea (19) que a su vez implica un procedimiento de mayor costo (20), y también más doloroso e invasivo para los donantes en comparación con la liposucción necesaria para obtener tejido adiposo (9). En segundo lugar, la ventaja más importante de las ASCs es que son más abundantes. Estudios recientes describen que 1 g de tejido adiposo puede contener entre $0,5 \times 10^6$ y 2×10^6 células (20,21), dependiendo de las características del donante como edad, género y tipo de tejido adiposo (subcutáneo o visceral) (22). De dichas células, un 10% correspondería a ASCs (20,21), en cambio, los aspirados de médula ósea presentan un promedio de 6×10^6 células nucleadas, de las cuáles solo entre un 0,001 a 0,01% corresponden a células madres (23), por lo que para alcanzar dosis terapéuticas (1-5 millones de células/Kg de peso corporal) (24) es necesaria la amplificación *ex vivo* (19). Por otra parte, se ha reportado que la tasa de proliferación es más rápida para las ASCs (28 h) que para las MSC-BM (39 h) (14), lo que permite una disminución en el tiempo de cultivo, pudiendo significar un menor riesgo de anomalías cromosómicas (25).

En síntesis, aun cuando ambos tipos celulares presenten características similares, se ha demostrado que las MSC-BM tienen algunas limitaciones frente a las ASCs (17), por lo que estas últimas son el foco de esta revisión.

4. APLICACIONES CLÍNICAS DE ASCS

Las ventajas que presentan las ASCs, han tenido como consecuencia que se generen múltiples aplicaciones clínicas en la medicina regenerativa. Estas han sido informadas recientemente, por ejemplo en el tratamiento del infarto de miocardio, esclerosis múltiple, osteoartritis y enfermedad de Crohn (26). Al inicio, los estudios existentes sugerían que las ASCs actuaban exclusivamente mediante la diferenciación a un linaje celular particular para reemplazar las células dañadas, sin embargo, la evidencia no era consistente para apoyar esta hipótesis (27). En la actualidad se describen varios mecanismos adicionales a través de los cuales las ASCs promueven la regeneración celular, como la acción que ejercerían en los nichos del hospedero estimulando el reclutamiento de células madres endógenas al área dañada (25) y principalmente, por medio de la secreción de citoquinas y factores de crecimiento, que incluyen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor estimulador de colonia granulocitos/macrófagos, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), lo que explica sus propiedades angiogénicas y de vascularización tisular (27,28).

En el infarto de miocardio (IM) se genera una pérdida de cardiomiocitos debida a la isquemia, lo que resulta en

una limitación de la función del miocardio. Actualmente el trasplante de células madres se estudia como una opción de tratamiento frente a las cirugías cardíacas, en modelos animales de IM, ya que se ha demostrado que contribuyen a la supervivencia del tejido cardíaco, promoviendo la angiogénesis y la posterior recuperación del flujo sanguíneo, mediante la producción de VEGF y factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) (29,30).

En el caso de la osteoartritis, los tratamientos actuales son sintomáticos, centrándose en reducir el dolor y controlar la inflamación, sin enfocarse en la regeneración del tejido articular. Por lo anterior, se han realizado estudios para evaluar la utilidad del tratamiento con ASCs en pacientes ancianos con osteoartritis de rodilla, obteniéndose buenos resultados clínicos, que demuestran eficacia en la cicatrización del cartílago, reducción del dolor y una mejora de la función en un periodo de 2 años de seguimiento (31,32).

Por su parte, la esclerosis múltiple es una patología autoinmune progresiva que se caracteriza por desmielinización neuronal, que afecta al sistema nervioso central, en la que también se presentan zonas de inflamación debido a la infiltración de células inmunitarias y anomalías vasculares (33). Al igual que para el caso anterior, el tratamiento farmacológico convencional no detiene eficazmente la degeneración del tejido afectado, por lo que se ha propuesto el tratamiento con MSCs. En este caso, las ASCs serían una mejor fuente de células debido a que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) (34) y promueven el proceso de remielinización, tanto directamente por la diferenciación a oligodendrocitos, como indirectamente gracias a la secreción de factores antiinflamatorios y neurotróficos, los que no tienen la misma capacidad de atravesar la BHE cuando se administran periféricamente (34).

Más significativo aún son los resultados que se han obtenido para el tratamiento de las fistulas en la Enfermedad de Crohn. Esta es una patología inflamatoria, que afecta principalmente el tracto gastrointestinal y puede presentar dolor abdominal, fiebre y obstrucción intestinal o diarrea (35). La complicación más frecuente es la formación de fistulas perianales, que poseen una estructura similar a la de un tubo, y conectan el intestino con la superficie corporal. Su origen se debe a un defecto epitelial causado por la inflamación en curso, la acción de mediadores como el TNF y la interleucina-13, y la presencia de microorganismos patógenos (36). El tratamiento de los pacientes con estas afecciones se centra en el uso combinado de un agente anti-TNF, (como el anticuerpo monoclonal infliximab), antibióticos e inmunosupresores (azatioprina o mercaptopurina), y en las situaciones más complicadas se recurre a intervenciones quirúrgicas. Sin embargo, el manejo eficaz de las fistulas es extremadamente difícil de conseguir (35), por lo que se ha recurrido al uso de las ASCs, las cuales han demostrado una eficacia similar a los tratamientos farmacológicos y una menor incidencia de efectos adversos, tales como las infecciones ocurridas como consecuencia del uso

prolongado de infliximab o la incontinencia fecal que puede resultar de las intervenciones quirúrgicas (37).

En 2005, fue publicado el primer estudio clínico de fase I referido al trasplante de ASCs para el tratamiento de las fistulas de la Enfermedad de Crohn (38). Este se realizó a un total de 5 pacientes que cumplían con los criterios establecidos: ser mayor de 18 años, haber sido diagnosticado 5 años antes del inicio del ensayo, poseer una o más fistulas refractarias al tratamiento farmacológico y a cirugía, y por último firmar el formulario de consentimiento informado. A su vez, se excluyeron a los pacientes que presentaran extrema delgadez, alergia a anestésicos locales, discapacidad mental y que padecieran de cáncer o SIDA. De manera excepcional uno de los pacientes fue excluido del estudio debido a una contaminación bacteriana de las células cultivadas. Para el trasplante se usaron células madres autólogas obtenidas por lipoaspiración del tejido adiposo de cada paciente. Estas células se cultivaron por 7 a 10 días, siendo algunas criopreservadas. Las células fueron caracterizadas mediante la identificación de los marcadores de superficie CD90, CD117 o c-Kit (un marcador de proliferación celular) y ausencia de los marcadores de células endoteliales CD34 y Factor de von Willebrand. Posteriormente, nueve fistulas fueron inoculadas con ASCs, de las cuales ocho fueron consideradas dentro del estudio y seguidas por un mínimo de ocho semanas. Como resultado se observó que en un 75% (6) de las fistulas se produjo la epitelización de la abertura externa al cabo de las ocho semanas, las que fueron consideradas como curadas, mientras que las otras dos presentaban un cierre incompleto de la abertura externa, pero con una disminución en el flujo de salida. Además, ninguno de los pacientes presentó reacciones adversas (38).

Si bien el estudio anterior no fue concluyente con respecto a la eficacia, debido al limitado número de pacientes y a la falta de control inherente a un estudio de fase I, fue útil para demostrar la seguridad del tratamiento y sirvió como base para los avances que actualmente existen. Desde esa fecha se han realizado varios estudios clínicos (26,39,40), siendo el último un estudio de fase III, aleatorizado, doble ciego y controlado frente a un placebo (41), que fue realizado en hospitales de 7 países europeos e Israel, desde julio de 2012 a julio de 2015, con un total de 212 pacientes seleccionados mediante criterios que incluían la edad del paciente (>18 años), la gravedad de la enfermedad debiendo ser inactiva o ligeramente activa de acuerdo al índice de actividad de la Enfermedad de Crohn (CDAI<220), la presencia de distintos tipos de fistulas perianales las que debían estar drenando por lo menos 6 semanas antes del inicio del ensayo y se excluyeron los pacientes que presentaban estomas divergentes o abscesos con longitud mayor a 2 cm que no drenaban adecuadamente. Además, la elección se basó en la refractariedad de los pacientes, ya que debían ser resistentes al tratamiento, ya sea con antibióticos como ciprofloxacino o metronidazol, inmunomoduladores como

azatioprina, 6-mercaptopurina o metotrexato, o tratamiento anti-TNF. Posteriormente, los pacientes recibieron una sola inyección de 120 millones de células (Cx601), las que podían ser distribuidas en hasta tres vías de la fistula, es decir, 40 millones de células por vía. A la semana 24, la tasa de remisión en pacientes tratados con Cx601 (49,5%) tuvo diferencias estadísticamente significativas en comparación con los pacientes tratados con placebo (34,4%). Por otra parte, el estudio confirmó un perfil de seguridad y tolerabilidad favorable. Estos resultados se mantuvieron y mejoraron a la semana 52 de seguimiento (41). Demostrando la eficacia y seguridad de Cx601 en el tratamiento a largo plazo de la cicatrización de las fistulas perianales en pacientes refractarios (41). Estos antecedentes finalmente dieron como resultado que Cx601 fuera designado como un medicamento huérfano por la EMA (42).

Adicionalmente, otros estudios ya habían determinado que el subtipo de MSCs óptimo para el tratamiento de fistulas eran las ASCs, en comparación con las MSC-BM porque si bien no presentaban diferencias estadísticamente significativas en la tasa de curación de las fistulas, la tasa de recurrencia era menor con ASCs (37,43,44). Así mismo se había establecido que la dosis recomendable era $2 - 4 \times 10^7$ células, debido a que ese rango presentaba un mejor índice de curación en comparación, tanto con dosis menores como mayores (37).

Según la información disponible en ClinicalTrials.gov (45) actualmente existe una amplia cantidad de ensayos clínicos completados, que demuestran el interés en el uso de las ASCs (Tabla 1). Un número importante corresponde a estudios de fase I y II que abarcan pequeños grupos de pacientes y están orientados a identificar efectos adversos, para dar paso a las siguientes fases. Además, de acuerdo a la información ahí disponible, es posible observar que las principales áreas de aplicación de las ASCs, son las relacionadas a isquemia y patologías autoinmunes, dentro de las que destacan las fistulas de la enfermedad de Crohn y la osteoartritis (Tabla 2).

Tabla 1. Estudios clínicos completados que utilizaron ASCs, según su fase de estudio.

Fase de estudio	Número
I	15
I/II	24
II	11
II/III	1
III	2

Fuente: elaboración propia a partir de búsqueda en www.clinicaltrials.gov.

Tabla 2. Ensayos clínicos completados que utilizaron ASCs como tratamiento.

Indicación	Número
Isquemia	
Infarto de miocardio	7
En extremidades/Enfermedad de Burger/Angiogénesis	5
Patologías autoinmunes	
Fístulas de Enfermedad de Crohn	6
Fístulas no asociadas a Enfermedad de Crohn	1
Osteoartritis	5
Artritis reumatoide grave/Artritis degenerativa	2
Esclerosis Lateral Amiotrófica/Esclerosis Múltiple	3
Tejidos blandos y duros	
Parálisis de cuerdas vocales	1
Fractura	1
Reconstrucción de mamas	1
Lipodistrofia	1
Epicondilitis lateral	1
Necrosis de cabeza femoral	1
Atrofia hemifacial progresiva	1
Ulceras de pie diabético	1
Otros	
Rechazo de trasplante de células hematopoyéticas	1
Quemadura de segundo grado/cicatrices profundas	2
Daño cerebral/Ataxia cerebral	2
Injuria en medula espinal	2
Disfunción eréctil	1
Incontinencia urinaria	1
Sepsis	1
Pacientes sanos	2

Fuente: elaboración propia a partir de búsqueda en www.clinicaltrials.gov.

5. ASPECTOS NORMATIVOS RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE ASCS

Ante el creciente interés en el potencial terapéutico de las ASCs en condiciones que son de difícil tratamiento, nace la necesidad de contar con normas estandarizadas para la recolección, procesamiento, identificación, preservación y distribución de las células madres que

aseguren su calidad y seguridad, ya que como cualquier fármaco tendrán efecto directo en la salud de las personas. Para cumplir con estos requerimientos es que la producción de ASCs debe realizarse bajo las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), que se definen como un sistema de aseguramiento de calidad, que garantiza que todos los aspectos de producción desde las materias primas, establecimientos, equipos, autoinspección, hasta la

formación e higiene del personal, se realizan de acuerdo a estándares de calidad para asegurar que los productos cumplen con las normas apropiadas para su uso previsto y según lo que exigen las autorizaciones de comercialización (46).

La terapia celular, debido a su naturaleza, requiere de consideraciones específicas debido a que presenta mayor variabilidad y mayor probabilidad de contaminación, frente a los productos farmacéuticos convencionales. Es un desafío aún mayor, la producción de células para uso clínico que estén en cumplimiento con las normas de BPM. A continuación, se analizará el estado del arte referente a las normas que regulan la producción de ASCs para terapia celular y los puntos críticos dentro de dicho proceso.

En Estados Unidos, la Food and Drug Administration (FDA) ha establecido un marco regulatorio basado en la prevención del uso de tejidos o células contaminadas y de la manipulación inadecuada que pueda dañar o contaminar dichos tejidos o células, y, por último, la seguridad del uso clínico de los tejidos o células, luego de ser procesados y combinados con otros componentes. De acuerdo con el Código de Reglamentos Federales, Título 21, Parte 1271 (47), los productos derivados de células y tejidos humanos (HCT/Ps) se clasifican en dos grupos con distintos niveles de regulación. Primero se encuentran los productos de bajo riesgo o “mínimamente manipulados” que incluyen a tejidos estructurales y células que al ser procesados no ven alteradas sus características biológicas originales, son de uso homólogo, no se combinan con otros componentes y no deben tener efecto sistémico ni depender de la actividad metabólica de las células vivas para su función primaria, o en el caso contrario ser solo de uso autólogo, estos productos “mínimamente manipulados” deben cumplir con las BPM. Por otro lado, se describen los productos de alto riesgo o “más que mínimamente manipulados”, que consideran procesos como expansión *ex vivo*, combinación con componentes que no son células o tejidos (28,48). Dentro de este grupo de productos biológicos se incluyen las MSCs derivadas de tejidos periféricos, como las ASCs, que además de producirse bajo las BPM deben cumplir con las especificaciones de las Buenas Prácticas Actuales de Tejidos (BPAT) (28,49). Estas normas comprenden tanto a las instalaciones, control medioambiental, equipos, controles de proceso, etiquetado, almacenamiento, distribución, como a la elección del donante y las pruebas que se debe realizar al producto.

En el caso de Europa, estas células se han clasificado como productos medicinales de terapia avanzada, ATMPs por sus siglas en inglés, y se rigen bajo la Regulación Europea No. 1394/2007 (50), que contiene normas para la autorización, supervisión y requerimientos técnicos referentes a las características del producto y su etiquetado, siendo preparado mediante métodos industriales o en instituciones académicas (51).

6. FACTORES CRÍTICOS EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN

6.1. Donantes

Para la selección de donantes la Directiva 2006//17/EC de la Comisión Europea, indica que se deben cumplir una serie de criterios que están enfocados en la salud y en los antecedentes patológicos de los donantes, excluyendo a personas con antecedentes de enfermedades de etiología desconocida, enfermedades malignas, infecciones generalizadas no controladas, con riesgo de transmisión de VIH, hepatitis B, hepatitis C y otras enfermedades transmisibles. Para esto, algunas de las pruebas biológicas a realizar incluyen la presencia de anticuerpos anti VIH-1,2, anti HbC y anti VHC- Ab. Además se debe contar con documentación que identifique al donante y los detalles de su consentimiento informado (52).

6.2. Recolección de muestras y aislamiento de ASCS

La recolección del tejido adiposo se puede realizar mediante una liposucción u otro procedimiento similar (53), que debe llevarse a cabo en condiciones asépticas y estériles (48) que garantice, además, la salud, seguridad e intimidad del donante (52). Para la extracción de la fracción vascular estromal desde el lipoaspirado, los sistemas cerrados, que corresponden a dispositivos automatizados herméticamente sellados, podrían ser utilizados en el quirófano luego de la cirugía, lo que reduciría el riesgo de contaminación ya que disminuyen la exposición al ambiente, pero estos sistemas no son compatibles con las normas de BPM vigentes, ya que para este procedimiento se requieren laboratorios de área limpia (27,54).

6.3. Áreas limpias

Tanto la EMA como la FDA, establecen que la fabricación de productos estériles debe realizarse en áreas limpias. Según la ISO 14644-1 estas áreas se clasifican de acuerdo a la concentración de partículas en el aire y para este caso se describen cuatro clases de áreas limpias (Tabla 3). Para las áreas clase A se permite un máximo de 3.520 partículas de tamaño $\geq 0,5 \mu\text{m}$ y 20 partículas de tamaño $\geq 5,0 \mu\text{m}$ por m^3 de aire, tanto en estado de “operación” como “en reposo”. Por su parte, para la clase B los límites son de 352.000 para partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}$ y 2.900 para partículas $\geq 5,0 \mu\text{m}$ en “operación”, mientras que “en reposo” son máximo 3.520 partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}$ y 29 partículas $\geq 5,0 \mu\text{m}$ (55).

Adicionalmente, un área clase A debe tener un flujo de aire unidireccional, con una velocidad de 0,36 a 0,54 m/s, que debe ser verificada mediante pruebas de visualización del aire. Estas áreas están descritas para zonas locales (cabinas), donde se llevan a cabo operaciones de alto riesgo como producción y llenado en condiciones asépticas. Por su parte, las áreas clase B deben ser el entorno de un área de clase A (56). Debido a ello la extracción y cultivo de las células madres en un sistema abierto, se debe realizar en una cabina clase A, dentro de una sala clase B (51). Mientras que las áreas C y D son

utilizadas para procedimientos menos críticos de la fabricación, en los cuales el producto no está directamente

expuesto (56).

Tabla 3. Máxima concentración permitida de partículas en el aire.
Máxima cantidad permitida de partículas por m³ según tamaño

Clase	En reposo		En Operación	
	0,5 µm	5,0 µm	0,5 µm	5,0 µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	No definido	No definido

Fuente: Adaptado de ISO 14644-1, 1999.

6.4. Personal

Según el Anexo 3 desarrollado por la OMS, referido a las normas GMP implicadas en la fabricación de productos biológicos, el personal responsable de la producción y control de los productos biológicos debe tener una formación afin con disciplinas científicas, tales como microbiología, biología, química, medicina, farmacia, farmacología, inmunología, entre otras. Además, el personal debe recibir capacitación respecto de los procedimientos de desinfección, higiene y microbiología, que enfatizan en el riesgo de contaminación microbiana, los microorganismos objetivos y los medios de cultivo utilizados. Por otra parte, para garantizar la seguridad del producto se debe considerar el estado de salud del personal, ya que éste no puede acceder al área de fabricación si presenta alguna enfermedad infecciosa o lesiones abiertas. Así también, se debe considerar la higiene del personal, quien debe llevar la vestimenta adecuada a una sala limpia estéril (capucha, mascarilla, overol, guantes libres de polvo y botas) (57).

6.5. Materiales

En la producción de ASCs se utilizan diversos materiales que participan en la recolección, digestión del tejido de origen y cultivo celular, como sueros, medios de cultivo, antibióticos (penicilina y estreptomycin) y enzimas (11,29,44,48,54), como tripsina (20) y colagenasa tipo I de origen bacteriano, aunque también podría utilizarse una tipo II o IV (54). Estos también pueden comprometer la calidad, seguridad y eficacia del producto final y ya que no se puede realizar una esterilización terminal del producto, cada sustancia debe ser claramente especificada y evaluada, garantizando su esterilidad, ausencia de agentes contaminantes y bajo nivel de endotoxinas (58). También se requiere, en especial para materiales de origen animal, la prevención y control de contaminación por agentes adventicios virales y no virales, como por ejemplo bacterias, hongos y agentes transmisibles de encefalopatía espongiiforme, como se indica en el Eudrallex, vol. 2B (59). El suero bovino fetal, que es usado en muchas investigaciones con ASCs (11,29,48,54,60) puede ser portador de agentes transmisibles de encefalopatía espongiiforme bovina. La FDA recomienda no utilizar dichos sueros si proceden de

animales que pertenezcan a países en los que se haya producido la enfermedad (61). Además la EMA recomienda que cuando se pueda elegir, se prefiera materiales derivados de animales no rumiantes o materiales que no sean de origen animal (62).

6.6. Infraestructura y equipos

Los productos biológicos no deben ser producidos ni envasados en áreas en que se fabriquen otros productos farmacéuticos (57). Además, deben estar separados de áreas donde se obtienen fluidos o tejidos biológicos, ya que ambos factores aumentan el riesgo de contaminación cruzada (58).

Por otra parte, tanto las áreas como los equipos implicados en la fabricación deben ser adecuados para la producción aséptica, por lo que se debe contar con procesos validados para sanitización y esterilización (57,58). En estos procesos se deben tomar precauciones en cuanto a la seguridad del personal y del medio ambiente, y además considerar que la elección de los agentes desinfectantes no debe afectar el posterior rendimiento de los equipos utilizados (57).

Como ya se mencionó, para el proceso de producción de ASCs se requieren instalaciones estériles que cumplan con las normas de BPM, como cabinas de bioseguridad clase A, dentro de salas clase B. Entre los equipos utilizados se encuentran filtros, pipetas estériles, centrífuga, citómetro de flujo y biorreactores (54).

7. CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO CELULAR

Se debe realizar una caracterización del producto en cuanto a su identidad, pureza y potencia (58). La FDA y la EMA establecen que la identidad de los productos celulares se debe determinar en cuanto a un patrón de expresión de marcadores de identificación (58,63). En el caso de las ASCs es necesario cumplir los criterios establecidos por la ISCT (8) que identifican de forma general a las MSCs provenientes de distintos tejidos, como se mencionó anteriormente:

(1) Adherencia al plástico, en condiciones estándares de cultivo (8).

(2) Marcadores de superficie específicos. Deben presentar CD105, CD73 y CD90 y carecer de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α y CD19. Sin embargo, a

través de las diversas investigaciones se han descrito algunas diferencias con respecto al perfil que presentarían las ASCs, llegando al consenso de que las ASCs resultan positivas para los marcadores: CD13, CD29, CD44, CD49d, CD90 y CD105. Siendo negativas para marcadores como CD14, CD31, CD45 y CD144, que corresponden a antígenos hematopoyéticos (9,64,65).

(3) Diferenciación a condroblastos, osteoblastos y adipocitos. Este criterio es el de mayor relevancia y se realiza induciendo la diferenciación de las ASCs a las líneas celulares ya mencionadas. La diferenciación a osteoblastos se puede llevar a cabo utilizando un medio de cultivo que contenga como agentes inductores osteogénicos, dexametasona (0,1 μ M), ácido L-ascórbico 2-fofato (50 μ M) y β -glicerofosfato (10 mM), que luego puede ser confirmada mediante tinción von Kossa, que produce un precipitado negro-marrón en presencia de fosfato de calcio (11,54). De modo similar, para la diferenciación a adipocitos se pueden utilizar como inductores: dexametasona (1,0 μ M), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX 0,5 mM), indometacina (0,2 mM) e insulina (10 μ M), dicha diferenciación se confirma mediante la formación de vacuolas y su tinción con Oil Red O. Conjuntamente, en el caso de los condroblastos, se puede inducir la diferenciación utilizando L-ascorbato-2-fosfato (50 μ g/mL), insulina (6,25 μ g/mL), transferrina (6,25 μ g/mL) y factor de crecimiento transformante β 1 (TGF β 1, 10 ng/mL), y se confirma la condrogénesis fijándolos en paraformaldehído al 4,0%, incubándolos con HCl (0,1 N) y determinando la presencia de proteoglicanos sulfatados con tinción Azul Alcían (54).

Por otra parte, un producto basado en células madres se puede considerar “puro” aun cuando contenga más de un tipo celular. Dentro de los contaminantes de interés se pueden presentar células madres residuales y células que se han diferenciado a un tipo celular no deseado, para las cuales se deben definir criterios de aceptación, que limiten su cantidad (58). Se considera que la ausencia de un contaminante de este tipo se podría garantizar por la incapacidad de detectar el tipo celular en una muestra del producto (63).

Por último, la potencia, que se reconoce como la medida cuantitativa de la actividad biológica de un producto, debe ser evaluada con respecto al efecto biológico deseado (63), es decir, a la respuesta clínica que se obtenga con las ASCs. Las pruebas de potencia pueden llevarse a cabo tanto *in vitro* en líneas celulares, como *in vivo* en animales, deben realizarse con un número validado de células y el resultado se expresa mediante el tiempo requerido para obtener el efecto buscado, como restauración de una función o reparación de una estructura anatómica (58).

8. CONCLUSIÓN

El gran progreso en el área de investigación de células madres derivadas de adipocitos ha logrado demostrar que éstas presentan ventajas que avalan el desarrollo que han tenido en su aplicación como terapia regenerativa,

mediante los múltiples ensayos clínicos que se están desarrollando y la primera terapia recientemente aprobada por la EMA, lo que las ha posicionado dentro del mercado farmacéutico. Estos avances significan un beneficio considerable para los pacientes, sobre todo para aquellos que sufren ciertas enfermedades que conllevan complicaciones de difícil manejo, en que el organismo no es capaz de recuperar su función con los tratamientos actuales. Se espera que esta alternativa de medicina regenerativa se siga potenciando, por lo que es de vital importancia llevar a cabo un proceso de producción que cumpla con los sistemas de calidad existentes. Por su parte, debido a alta variabilidad que pueden presentar los productos celulares de acuerdo a su producción, se considera necesario que dichos sistemas de calidad también se sigan desarrollando y sean cada vez más específicos para cada producto celular, con el fin de asegurar la eficacia y seguridad en los pacientes.

9. LISTA DE ABREVIATURAS

ASCs adipose-derived stem cells, células troncales derivadas de tejido adiposo.

bFGF factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos.

BHE barrera hematoencefálica.

BPA buenas prácticas actuales de tejidos.

BPM buenas prácticas de manufactura.

DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium.

EMA Agencia Europea del Medicamento.

FDA Food and Drug Administration.

FGF-2 factor de crecimiento de fibroblastos 2.

HGF factor de crecimiento derivado de hepatocitos.

IM infarto al miocardio.

ISCT International Society for Cellular Therapy.

MSC-BM mesenchymal stem cells derived from bone marrow, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.

MSCs células madre mesenquimales.

SC stem cells, células madre.

SVF fracción vascular estromal.

VEGF factor de crecimiento endotelial vascular.

CONFLICTO DE INTERÉS

INBIOCRIOTEC SA es un Consorcio Biotecnológico chileno y tiene por objeto transferir al mercado, invenciones, servicios, productos y/o terapias de alta tecnología en ingeniería de tejidos y bancos de criopreservación en forma rentable y que apoyen el desarrollo de la Medicina Regenerativa para el mercado nacional e internacional.

10. AGRADECIMIENTOS

Caroline Weinstein-Oppenheimer y Patricia Carreño González son investigadoras del Centro de Investigación Farmacopea Chilena, Universidad de Valparaíso, Chile.

11. REFERENCIAS

1. Hsu Y, Fuchs E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(2):103–14.
2. Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadani S, et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran.* 2017;55(1):6–23.
3. Shoukhrat M, Wolf D. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2009;114:185–99.
4. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007;131(5):861–72.
5. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76.
6. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, et al. Stem Cell Function, Self-Renewal, and Behavioral Heterogeneity of Cells from the Adult Muscle Satellite Cell Niche. *Cell.* 2005;122(2):289–301.
7. Moore KA, Lemischka IR. Stem Cells and Their Niches. *Science (80-).* 2006;311(5769):1880–5.
8. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
9. Zuk P. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells.* 2013;2013(1).
10. Giacoppo S, Bramanti P, Mazzon E. The transplantation of mesenchymal stem cells derived from unconventional sources: an innovative approach to multiple sclerosis therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2017;1–17.
11. Zuk P, Ph D, Zhu MIN, Mizuno H, Benhaim P, Lorenz HP. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211–28.
12. Hanke A, Prantl L, Wenzel C, Michael N, Brockhoff G, Loibl M, et al. Semi-automated extraction and characterization of Stromal Vascular Fraction using a new medical device. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016;64(3):403–12.
13. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007;100(9):1249–60.
14. Zhu X, Shi W, Tai W, Liu F. The comparison of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 2012;350(2):277–87.
15. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(20):9363–7.
16. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso ZC, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174:101–9.
17. Schäffler A, Büchler C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells.* 2007;25(4):818–27.
18. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International S. *Cytotherapy.* 2013;15(6):641–8.
19. Fekete N, Rojewski M, Fürst D, Kreja L, Ignatius A, Dausend J, et al. GMP-Compliant Isolation and Large-Scale Expansion of Bone Marrow-Derived MSC. *PLoS One.* 2012;7(8):1–13.
20. Zhu Y, Liu T, Song K, Xiubo F, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct.* 2008;26(6):664–675.
21. Aust L, Devlin B, Foster S, Halvorsen Y, Hicok K, du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy.* 2004;6(1):7–14.
22. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: Tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012;2012.
23. Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (80-).* 1999;284(5411):14–147.
24. Subbanna P. Mesenchymal stem cells for treating GVHD: in-vivo fate and optimal dose. *Med Hypotheses.* 2007;69(2):469–70.
25. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016;64(6):443–54.
26. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2008;8(9):1417–123.
27. Jeffrey G, Bunnell B, Guilak F. Clinical Translation. *Regen Med.* 2012;7(2):225–35.
28. Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A, Rohrich R. Human Adipose Stem Cells: Current. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(6):1277–90.
29. Ii M, Horii M, Yokoyama A, Shoji T, Mifune Y, Kawamoto A, et al. Synergistic effect of adipose-

- derived stem cell therapy and bone marrow progenitor recruitment in ischemic heart. *Lab Investig.* 2011;91(4):539–52.
30. Mazo M, Gavira JJ, Pelacho B. Adipose-derived Stem Cells for Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011;4(2):145–53.
 31. Koh YG, Choi YJ. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *Knee.* 2012;19(6):902–7.
 32. Koh YG, Choi YJ, Kwon SK, Kim YS, Yeo JE. Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. *Knee Surg Sport Traumatol Arthrosc.* 2013;23(5):1308–16.
 33. Loma I, Heyman R. Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment. *Curr Neuropharmacol.* 2011;9(3):409–16.
 34. Ghasemi N. Therapeutic effects of adipose derived mesenchymal stem cells on remyelination process in inflammatory demyelinating diseases. *J Histo Histopathol.* 2015;2(1):1–8.
 35. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet.* 2012;380(9853):1590–605.
 36. Scharl M, Rogler G. Pathophysiology of fistula formation in Crohn's disease. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2014;5(3):205–12.
 37. Cao Y, Ding Z, Han C, Shi H, Cui L. Efficacy of Mesenchymal Stromal Cells for Fistula Treatment of Crohn's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dig Dis Sci.* 2017;62(4):851–60.
 38. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum.* 2005;48(7):1416–23.
 39. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual J, Del-Valle E, Zorrilla J, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum.* 2009;52(1):79–86.
 40. García-Olmo D, Herreros D, Pascual M, Pascual I, De-La-Quintana P, Trebol J, et al. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *Int J Colorectal Dis.* 2009;24(1):27–30.
 41. Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, Baumgart DC, et al. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet.* 2016;388(10051):1281–90.
 42. Defrancesco L, Lilly BE. Drug pipeline: 2Q17. *Nature Biotechnology.* 2017; 8;35(8):703.
 43. Molendijk I, Bonsing BA, Roelofs H, Peeters KCMJ, Wasser MNJM, Dijkstra G, et al. Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Healing of Refractory Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology.* 2015;149(4):918–27.
 44. De la Portilla F, Alba F, García-Olmo D, Herreras JM, González FX, Galindo A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I / IIa clinical trial. *Int J Color Dis.* 2013;28(3):313–23.
 45. National Institutes of Health. *ClinicalTrials.gov*. Registry and results database of publicly and privately supported clinical studies of human participants conducted around the world. 2013.
 46. WHO Technical Report Series No. 908. WHO Good manufacturing practices for pharmaceutical products: main principles, Annex 2. Geneva; 2014.
 47. 21 C.F.R. § 1271.3. 2016.
 48. Larijani B, Aghayan H, Goodarzi P, Mohamadi-Jahani F, Norouzi-Javidan A, Reza Dehpour A, et al. Clinical Grade Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Banking. *Acta Med Iran.* 2015;53(9):540–6.
 49. 21 C.F.R. §1271 Subpart D. 2017.
 50. European Commission. Regulation (EC) No 1394/2007 of The European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. *Off J Eur Union.* 2007;50:121–37.
 51. Sensebé L, Gadelorge M, Fleury-Cappellesso S. Production of mesenchymal stromal / stem cells according to good manufacturing practices : a review. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):66–71.
 52. Commission Directive 2006/17/EC. Implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. 2006.
 53. Gimble JM, Guilak F, Bunnell BA. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(2):19–26.
 54. Zhu M, Heydarkhan-Hagvall S, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P. Manual Isolation of Adipose-derived Stem Cells from Human Lipoaspirates. *J Vis Exp.* 2013;79:1–10.
 55. ISO14644-1. Clean rooms and associated controlled environments. Part 1: Classification of airborne particles. Geneva; 1999.
 56. WHO Technical Report Series No 961. WHO good manufacturing practices for sterile pharmaceutical products, Annex 6. 2011.
 57. WHO Technical Report Series No. 996. WHO good manufacturing practices for biological products, Annex 3. Geneva; 2016.
 58. Committee for Medicinal Products for Human Use.

- Guideline on human cell-based medicinal products. EMEA/CHMP/410869/2006. 2006.
59. Commission Directive 2003/63/EC. Eudralex Volume 2B, Notice To Applicant, part II-V: virological documentation. 2003.
 60. Mizuno H, Tobita M, Uysal A. Concise review: adiposederived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. 2012;30(5):804–10.
 61. Asher D. Bovine sera used in the manufacture of biologicals: current concerns and policies of the U.S. Food and Drug Administration regarding the transmissible spongiform encephalopathies. *Dev Biol Stand*. 1999;99:41–4.
 62. Committee for Medicinal Products for Human Use. Note for guidance on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products. EMA/CHMP/BWP/457920/2012. 2012.
 63. Gould Halme D, Kessler DA. Health Policy Report: FDA Regulation of Stem Cell Based Therapies. *N Engl J Med*. 2006;355:1730–5.
 64. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279–95.
 65. Zannettino A, Patron S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gumble J, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 2008;214(2):413–21.