

PROSPETTIVE FUTURE

Future directions

Riassunto

La guarigione ossea è stata, negli ultimi 50 anni, argomento d'intensa attività di ricerca. Migliorare la comprensione dei fattori di rischio, della gestione clinica e degli eventi a livello molecolare ha permesso di conoscere meglio i fattori che potrebbero contribuire al fallimento della guarigione ossea. La conoscenza di questi argomenti è ormai essenziale per la pratica quotidiana della maggioranza degli specialisti ortopedici. La riparazione e la rigenerazione ossea sono considerate delle condizioni cliniche complesse; il "concetto del Diamante", poi evolutosi in quello del "Pentagono", sono la base teorica e pratica della guarigione ossea. Le proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs) in associazione con altri fattori di crescita e cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono di grande interesse per tutta la comunità scientifica impegnata nello studio dei meccanismi di guarigione delle fratture e delle modalità di osteointegrazione. Un'altra frontiera emergente è quella della terapia genica, che si fonda sul trasferimento di materiale genetico nella cellula bersaglio permettendo l'espressione di mediatori dalle cellule stesse per un periodo prolungato di tempo. Si tratta di un settore multidisciplinare in forte crescita che coinvolge la medicina e la bio-ingegneria; il campo dell'"ingegneria tissutale" sembra poter rivoluzionare il trattamento di pazienti che presentano difficoltà nella guarigione ossea. In questa pubblicazione si segnalano i possibili sviluppi futuri in materia di ricerca e applicazioni cliniche.

Parole chiave: biotecnologie, fattori di crescita, pseudoartrosi, cellule staminali mesenchimali, concetto del diamante

Summary

The underlying of bone healing process has been a topic of intense research activity over the past 50 years. Increasing understanding of risk factors, clinical management and events on a molecular aspect has allowed a greater understanding of factors that might contribute to failure of bone healing. Knowledge of these topics is essential to the daily practice of the majority of orthopaedic

consultants. As long as bone repair and regeneration is considered as a complex clinical condition, the diamond concept, later evolved into the pentagon's one, is the theoretical and practical basis for the bone healing. The effectiveness or not of bone morphogenetic proteins (BMPs) in association with other growth factors and with mesenchymal stem cells in bone regeneration for fracture healing and bone allograft integration is of great interest to the scientific community. Another emerging approach is the application of gene therapy where the transfer of genetic material into targeted cell's genome allows the expression of bioactive mediators from the cells themselves over a prolonged period of time. An emerging multidisciplinary field involving medicine and bio-engineering, the field of 'tissue engineering' is expected to revolutionize the treatment of patients with impaired bone healing. In this lecture we point out possible future developments in concerning research and clinical applications.

Key words: biotechnology, biotech, growth factors, nonunion, mesenchymal stem cells, diamond concept

INTRODUZIONE

Il trattamento delle pseudoartrosi è oggi più che mai un momento di cura del malato ancor prima che della sua malattia. Si tratta infatti spesso di pazienti giovani o con residue importanti richieste funzionali, spesso sottratti all'attività lavorativa per lunghi periodi e con conseguenti elevati costi sociali. L'aumento sia della popolazione attiva che del livello medio di attività ha portato e porterà a un incremento della casistica traumatologica. Inoltre il miglioramento del livello di sicurezza sia sulla strada che sul lavoro portano oggi a una drastica diminuzione della mortalità con un conseguente incremento sia dei politraumatizzati che dei polifratteggiati.

Nonostante il continuo miglioramento degli strumentari e delle tecniche chirurgiche, si riscontrano casi "radiografici" che, benché trattati in modo talvolta "avventuroso", giungono a guarigione e, al contrario, casi "radiografici" che benché trattati in modo corretto faticano a guarire o non guariscono affatto.

Tale osservazione, prescindendo dalla ovvia casualità, ha però spostato l'attenzione dall'aspetto puramente radiografico a un aspetto più prettamente clinico ed epidemiologico.

Si è fatta quindi sempre più chiaramente strada l'opinione che potessero esistere fattori di rischio riconducibili a questa difficoltà di guarigione. Nel 2007 vennero individuati attraverso lo studio della letteratura internazionale tutti i possibili fattori di rischio nella guarigione delle fratture¹. Successivamente venne elaborato un sistema classificativo a punteggio il "Non Union Severity Score (NUSS)"² con una duplice finalità: quella di individuare non un "caso radiografico" ma un "paziente", e individuare quindi in

**G.M. CALORI, E.L. MAZZA, M. COLOMBO,
C. RIPAMONTI, S. MAZZOLA**

Istituto Ortopedico Gaetano Pini U.O.C. COR (Chirurgia
Ortopedica Riparativa e Risk Management), Milano

Indirizzo per la corrispondenza:

Giorgio Maria Calori

p.za Cardinale Andrea Ferrari 1, 20122 Milano

E-mail: gmc@studiocalori.it - dottmazza@yahoo.com

relazione all'effettivo rischio di non guarigione quei casi nei quali sia necessario non solo un corretto trattamento chirurgico ma anche un opportuno approccio biotecnologico.

Questo ha permesso di elaborare delle linee guida per la nostra società madre, la SIOT, che sono state quindi oggetto di pubblicazione scientifica³.

Per ben comprendere quali siano le prospettive future bisogna chiarire quali siano le opportunità oggi offerte dalle biotecnologie e quali i limiti; nonostante l'inevitabile giudizio soggettivo è necessario attenersi nel modo più rigoroso possibile a quanto posto in evidenza dalla letteratura internazionale alla quale l'Italia contribuisce in modo integrante anche grazie al lavoro svolto presso il nostro centro.

BIOTECNOLOGIE

Le biotecnologie a nostra disposizione possono essere identificate in: fattori di crescita sintetici (GFs) come le proteine morfogenetiche ossee ricombinanti umane (rh-BMPs), fattori di crescita autologhi (AGFs) contenute nel plasma arricchito di piastrine (PRP), cellule staminali mesenchimali (MSCs) e scaffold. Andiamo ora ad approfondire tali biotecnologie analizzandone i principali studi in merito.

GROWTH FACTORS (GFS)

È stato dimostrato ormai, già dalla metà degli anni 'Novanta, che alcuni fattori di crescita agiscono come potenti stimolatori della proliferazione osteoblastica in vitro e della guarigione ossea in vivo, tali da rivelarsi assai utili nel favorire i processi di guarigione se correttamente applicati nella sede di lesione⁴. Grazie all'evoluzione dell'ingegneria tissutale, infatti, è stato possibile produrre i singoli fattori di crescita con la tecnica del DNA-ricombinante, in particolare le rh-BMPs. Sebbene siano state individuate almeno quaranta diverse rh-BMPs, una chiara dimostrazione clinica del potenziale osteoinduttivo è disponibile a oggi solo per la rh-BMP-7, detta anche osteogenic protein-1 (OP-1), e la rhBMP-2⁵ appartenenti alla famiglia dei fattori di crescita trasformanti TGF- β i cui recettori sono espressi su condrociti e osteoblasti⁶. Il fenomeno dell'osteoaduzione è caratterizzato dalla trasformazione delle cellule mesenchimali perivascolari in cellule osteoprogenitrici in grado di rigenerare tessuto osseo⁷. A oggi solo la rhBMP-7 può essere considerata un agente osteoinduttivo. La *recombinant human osteogenic protein-1* (rhOP-1), nota anche come rh-BMP-7 (eptotermina α), veicolata dal collagene di tipo 1, è la prima approvata nel mondo per il trattamento delle pseudoartrosi delle ossa lunghe e negli Stati Uniti come "*humanitarian device exemption*" (HDE) nella cura delle pseudoartrosi spinali. La matrice collagena rappresenta il veicolo della rhBMP-7; essa è insolubi-

le e fornisce un'appropriata impalcatura biorassorbibile per i processi di proliferazione e differenziazione delle cellule, indotti dal principio attivo. Consente, inoltre, la ricrescita ossea dal tessuto osseo vascolarizzato e sano circostante verso l'area interna deficitaria. In Europa, rh-BMP-7, è registrata come farmaco con indicazione specifica per il trattamento delle pseudoartrosi della tibia refrattarie all'autotrapianto o nei casi in cui l'autotrapianto non sia possibile. L'rh-BMP-7 viene commercializzata in una fiala sterile che deve essere addizionata con 2-3 ml di soluzione fisiologica; il preparato viene quindi applicato sulla lesione, previa osteosintesi stabile ed efficace⁸. Grazie a innumerevoli studi pre-clinici e clinici l'uso dell'rh-BMP-7 è consolidato riportando in alcuni studi percentuali di successo tra l'85 e l'89%; in particolare lateralmente si è riscontrato un netto decremento di tutte le complicanze legate all'uso di osso autologo, considerato ancora oggi il "*gold standard*". In particolare, si sono evitate tutte le difficoltà connesse al prelievo autoplastico (ala iliaca, perone o stecca tibiale), che determinano scarsa *compliance* per il paziente con permanenza nel 20% dei casi di dolore cronico residuo a livello del sito donatore, penalizzazione dei tempi operatori chirurgici e anestesilogici, frequenti complicanze nella sede del prelievo (morbilità del sito donatore), tali da incidere in maniera negativa sia sullo stesso paziente che sulla spesa economica aziendale della struttura sanitaria. Per ultimo, ma non per importanza, va considerato l'aumento dei tempi operatori legati al prelievo di osso autologo con conseguente incremento proporzionale del rischio di infezione⁹⁻¹³. Studi originali e trial internazionali (di livello 1) hanno quindi dimostrato l'efficacia delle BMP-7 nella guarigione delle PSA riportando dati che dimostrano una capacità osteoinduttiva pari e a volte superiore all'innesco di osso autoplastico. Nel 2001 Friedlaender e coll. hanno riportato lo stesso tasso di guarigione dell'rhBMP-7 rispetto al trapianto autologo in una serie di 124 PSA tibiali. L'applicazione di rh-BMP-2 in 150 fratture esposte di tibia - studio *BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma* (BESTT)¹⁴ - e in 134 artrodesi vertebrali ha dimostrato una superiore capacità di guarigione se paragonate all'autotrapianto¹⁵. De Long e coll., in un'importante review del 2007 su trapianti ossei e sostituti, conclusero che l'utilizzo clinico, supportato da un livello di evidenza scientifica 1, esiste a oggi solo per le rh-BMP¹⁶. Dinopoulos e coll. nel 2007 hanno studiato l'applicazione delle due BMPs disponibili (rh-BMP-2 e rh-BMP-7) nel trattamento di PSA delle ossa lunghe, concludendo che solo rh-BMP-7 raggiunge un livello di evidenza 1 e quindi può rappresentare una valida alternativa all'autotrapianto in queste patologie¹⁷. Un recente studio randomizzato su 60 PSA delle ossa lunghe e uno studio multicentrico su 68 PSA di tibia, hanno dimostrato che l'impiego di rh-BMP-7 ha un

tasso di guarigione (da 86,6 a 89,7%) superiore all'autotrapianto. In conclusione, rh-BMP-7 è: un farmaco con una dose chiara e costante¹⁸; un agente in grado di indurre la formazione di nuova matrice ossea (osteoinduttività); l'unico fattore di crescita con una riconosciuta abilità di indurre la differenziazione delle cellule osteoprogenitrici in pre-condroblasti e pre-osteoblasti¹⁹.

AUTOLOGUS GROWTH FACTORS (AGFS) - PLATELET-RICH PLASMA (PRP)

Il PRP è il prodotto più avanzato del "Blood Management": è un concentrato biologicamente attivo di mediatori estratti dal plasma del paziente ed è una fonte di fattori di crescita autologhi aspecifici [fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), TGFβ1-β2, fattore di crescita insulino-simile di tipo 1-2 (IGF1-2), fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF)] in grado di stimolare i processi riparativi ossei, cartilaginei e dei tessuti molli nella sede di impiego. È caratterizzato da un'elevata concentrazione di trombociti in grado di degranulare diversi fattori di crescita e citochine che inducono l'osteogenesi e l'angiogenesi con meccanismo chemiotattico e mitogenetico²⁰. Può essere ottenuto da sangue autologo o eterologo. Nel primo caso viene utilizzato sangue del paziente diminuendo la probabilità d'infezioni o di reazioni crociate. Il volume di sangue prelevato non risulta essere emodinamicamente significativo per cui il prelievo può essere effettuato in sala operatoria nel momento stesso dell'intervento, la cui durata non viene dunque prolungata. Attualmente esistono anche preparati da sangue eterologo, vengono prodotti in collaborazione con il centro trasfusionale, i costi di produzione sono sicuramente inferiori, offrendo un prodotto altrettanto sicuro se vengono rispettati degli standard di sicurezza e certificazione. La raccolta degli emocomponenti necessari per la produzione del gel piastrinico può essere effettuata secondo un metodo di tipo classico e uno di tipo automatizzato. A seconda della procedura utilizzata si possono ottenere concentrazioni piastriniche finali dalle quattro alle otto volte superiori a quelle iniziali. La concentrazione delle piastrine e quindi degli AGF, sembra essere l'elemento cruciale per influenzare il risultato clinico. Nell'ambito della chirurgia maxillofaciale Marx²¹ espose un tasso di maggior densità dell'osso trabecolare nel gruppo trattato con PRP in casi di ricostruzione mandibolare. Tuttavia, risultati più scoraggianti giunsero prima da Fennis²² sulla mandibola di topi e poi da Lowery et al.²³ sulla colonna di conigli, che dimostrarono una percentuale di risultati positivi con uso di PRP pari a circa il 30%. Anche studi più recenti sempre in animali²⁴ e in chirurgia vertebrale^{25,26} confermano questi dati. Infine in uno studio randomizzato del 2007 condotto su 60 PSA delle ossa lunghe si è dimostrata una minore capacità di guarigione da parte del PRP (63,8%) sia nei

confronti delle BMP-7 sia in paragonato all'autograft²⁷. In conclusione, gli AGFs contenuti nel PRP, come chiarito dai dati preclinici e clinici, sono: promotori della divisione cellulare (mitogenesi); non specifici per le cellule ossee; incapaci di promuovere la differenziazione delle cellule mesenchimali e di indurre la formazione di nuovo tessuto osseo. Non sembrano essere molto utili quando usati da soli o in associazione con scaffold nel trattamento delle PSA delle ossa lunghe.

MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCS)

Studi basati su terapie cellulari si sono concentrati su una rara popolazione di cellule non-ematopoietiche, le MSCs, che sono presenti nel midollo osseo dei pazienti e possono essere ampliate in cultura in uno stato indifferenziato^{28,29}. Oltre alle loro proprietà pluripotenti, le MSCs sono considerate cellule progenitrici osteogeniche con dimostrata capacità di riparazione dei difetti ossei³⁰. Tuttavia, un aspetto non va sottovalutato: la loro non sempre elevata concentrazione nel midollo osseo^{31,32}. L'idea di arricchire una matrice con le MSCs o il loro diretto impianto non è una novità³³. Tutte le strategie messe in atto sono state caratterizzate dalla raccolta di cellule del midollo osseo da cresta iliaca e loro espansione in coltura³⁴; in vitro, però, l'isolamento e la differenziazione delle MSCs richiedono tempo, lavoro e costi notevoli. Recentemente nuove tecniche si sono rese disponibili, tra cui l'aspirato di midollo osseo del paziente. Questa tecnica, permette la concentrazione di cellule staminali mesenchimali direttamente in sala operatoria: da processi di centrifugazione che separano i componenti cellulari per la loro densità oppure da processi di ritenzione (filtrazione) che sfruttano la naturale affinità selettiva delle MSCs a una matrice ossea di origine animale o di sintesi, così imbevuto in pressione negativa di MSCs. Questi nuovi metodi mostrano due evidenti vantaggi: meno costi rispetto all'espansione in vitro delle MSCs e un abbassamento drastico della morbilità del sito donatore rispetto alla tradizionale raccolta a cielo aperto dalla cresta iliaca. L'applicazione umana di MSC si è dimostrata efficace in 53 pazienti in una serie di 60 PSA delle ossa lunghe^{35,36}. In tutti i casi è stata applicata un'iniezione di 20 cm³ di MSCs, ottenute per centrifugazione, nel sito di PSA. In questo studio l'autore sottolinea l'influenza del numero e della concentrazione delle cellule progenitrici come fattore chiave per ottenere la guarigione. Nel gruppo guarito (88,3%), infatti, la concentrazione di cellule progenitrici osservata è stata >1.500/cm³, mentre nel gruppo dei fallimenti (11,7%) la concentrazione rilevata è stata <1.000/cm³. Infine, lo studio di Hernigou ha mostrato che il trapianto autologo percutaneo di midollo osseo è un trattamento sicuro per le PSA asettiche e atrofiche della diafisi tibiale³⁷, in assenza di complicanze locali o sistemiche. Tuttavia permangono

degli interrogativi, in particolare non esiste un consenso comune relativo alla possibile diminuzione di MSCs con potenziale osteogenico con il crescere dell'età^{38 39}. Esiste una grande variabilità di concentrazione delle MSC nel midollo osseo dei pazienti, tra le 200 e le 2.000 MSCs per ml⁴⁰, e, in alcune malattie o alcune co-morbilità (fumatori), le cellule del midollo possono essere danneggiate o ridotte di numero⁴¹. Infine, il tasso di guarigione non supera l'88%. L'applicazione di MSCs adulte, considerate avere proprietà osteogeniche e osteopromotrici, prelevate dal midollo osseo e concentrate attraverso centrifugazione in sala operatoria ha dimostrato costi inferiori alle espansioni cellulari di laboratorio e discreta efficacia di osteoinduzione cellulo-mediata (livello B di raccomandazione) se in concentrazioni superiori a 60.000 μ l secondo i criteri della *evidence-based medicine*. L'uso clinico delle MSCs in pseudoartrosi si è dimostrato efficace nel determinare la guarigione delle PSA, soprattutto se associate a BMPs⁴².

SCAFFOLD

L'osteocostruzione è determinata dalle caratteristiche chimico fisiche del substrato atto a favorire l'adesione e la crescita cellulare di superficie. Le caratteristiche meccaniche degli innesti ossei e la loro resistenza in compressione e torsione sono influenzate dalla loro forma (massivo, stecca corticale, blocco spongioso, morcellizzato), dalle modalità di prelievo, di processazione e conservazione e dal tipo di mezzi di sintesi utilizzati.

Matrice ossea demineralizzata: (DBM, collagene + proteine non collageniche); si ottiene dalla demineralizzazione della corticale di ossa lunghe; ha dimostrato potenziale osteogenico grazie alla presenza di BMPs e di altri fattori come il TGF β e l'IGF⁴³. Può essere "pura" o associata a un *carrier* biologico (porcino) o sintetico (acido ialuronico o glicerolo); può essere preparata senza particolari difficoltà e conservata senza perdere le sue proprietà osteoinduttive e osteoconduttive. Essendo parte della categoria di derivazione dell'osso omologo ne condivide il rischio biologico. Tuttavia, la DBM ha dimostrato una capacità osteoinduttiva inferiore rispetto all'autotrapianto⁴⁴ e ha mostrato un'elevata variabilità di concentrazione di BMP-2 e BMP-7, in differenti prodotti⁴⁵.

Sostituti di sintesi: sono strutture minerali simili a quelle dell'osso umano. Hanno potere solo osteoconduttivo. Tra i sostituti di sintesi figurano il calcio fosfato e le ceramiche di calcio fosfato come l'idrossiapatite, l'idrossiapatite corallina (riassorbibile), il tricalcio fosfato (TCP, riassorbibile) e il calcio fosfato bifasico (BCP = HA+TCP). L'idrossiapatite è il materiale più utilizzato ed è disponibile in forma granulare riassorbibile o non riassorbibile e in forma solida, anch'essa nelle varianti riassorbibile e non riassorbibile. Per difetti di piccole

dimensioni le idrossiapatiti sono dei buoni riempitivi e favoriscono, grazie alle loro proprietà osteoconduttive, la rivascularizzazione e la ri-ossificazione progressiva dell'area trattata. Tutti i materiali disponibili hanno dei limiti evidenti. In particolare, le ceramiche sono disponibili sotto forma di polveri, di cementi o di impianti porosi e presentano almeno tre svantaggi importanti: la difficoltà di essere mantenute in sede, il lungo tempo necessario per il riassorbimento e la completa sostituzione con osso neoformato e l'impossibilità a colmare gap ossei importanti. Pertanto, i sostituti ossei di sintesi, non sono molto utili quando usati da soli nel trattamento delle PSA atrofiche delle ossa lunghe⁴⁶.

Sostituti biologici: riconosciuti come "non-self", gli allotrapianti vengono aggrediti dal sistema immunitario. Essi hanno dimostrato potere osteoconduttivo ma non osteoinduttivo. Devono, quindi, essere rivascularizzati e ripopolati dall'esterno, richiedendo un ambiente circostante favorevole. Possono essere utilizzati come riempitivi (morcellizzato) oppure come supporto meccanico (stecche). L'osso eterologo, detto anche xenograft, è tessuto osseo di derivazione bovina, equina o suina. Esso non viene demineralizzato, ma reso immunologicamente inerte (deantigenizzato). Esistono differenti prodotti con diverse caratteristiche biomeccaniche legate alla forma e al livello di demineralizzazione ottenuto.

CAMERA BIOLOGICA

Il "concetto di Diamante", ha portato alla necessità di individuare uno spazio fisico all'interno del quale si possano sviluppare le maggiori attività biologiche necessarie al processo di guarigione. Uno spazio non così facile da determinarsi nel quale esista un equilibrio tra la necessità di "contenere" quanto si ritenga necessario utilizzare e di permettere quegli scambi selettivi che sono alla base di un processo biologico vitale⁴⁷. La "camera biologica", rappresenta quindi un vero e proprio bioreattore capace di massimizzare gli effetti conseguenti alle biotecnologie utilizzate⁴⁸.

POLITERAPIA

L'oggettiva difficoltà di casi specifici, evidenziata e classificata correttamente da un NUSS elevato, non può essere che rappresentativa di un caso che, a fronte di presumibili necessità meccaniche e di corretto trattamento chirurgico, presenta delle reali difficoltà biologiche.

Tale difficoltà biologica, è presumibilmente da ricercarsi in un'espressione genica^{49 50}, ma è difficile da essere valutata nelle sue componenti essenziali e ancor di più nel singolo caso clinico. Appare quindi necessario cercare di ricreare quell'insieme di elementi che dovrebbero caratterizzare un fisiologico processo di guarigione. Tra questi elementi ritroviamo oltre alla stabilità meccanica, che ri-

mane la "conditio sine qua non" del processo biologico, la ricerca di quelle cellule capaci di differenziarsi in cellule osteoprogenitrici, i fattori di crescita che spingano tali cellule a differenziarsi e un eventuale supporto meccanico intercalare affinché questo avvenga. La politerapia risulta in effetti la logica messa in pratica dei principi espressi dal "diamond concept".

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Lo studio sempre più approfondito di quelle che sono le cause che portano alla pseudoartrosi sono oggi quanto mai importanti. La nuova frontiera sarà quella della terapia genica e cioè della possibilità di trasportare nel paziente quei geni atti a determinare la cascata di eventi che portano alla formazione di un callo e alla sua maturazione in osso valido.

Numerosi studi, su animale, evidenziano oggi come la terapia genica sia attuabile sia con l'utilizzo di *virus car-*

rier^{51 52} sia con l'utilizzo di altri *carrier* non virali come ad esempio particolari campi elettrici pulsati (DNA *electroporation*)⁵³.

Tali terapie sono ancora però oggi realtà futuribili e prevedono un'ulteriore ampia valutazione pre-clinica e clinica. Tanta strada è stata però ad oggi percorsa sul terreno della conoscenza e del trattamento clinico delle pseudoartrosi e riteniamo che il futuro prossimo sia la comprensione di quanto la patologia pseudoartrosica possa essere di per sé una patologia in un paziente predisposto. Tale patologia prevede, in alcuni selezionati casi, un'eziologia "biologica" e benché trattata correttamente da un punto di vista chirurgico potrebbe non andare a guarigione esattamente, come una ferita potrebbe degenerare in un cheloide cicatriziale benché correttamente suturata. Come patologia deve essere quindi compresa, analizzata e classificata e quindi trattata correttamente sia sotto il profilo chirurgico che biologico.

Bibliografia

- Calori GM, Albisetti W, Agus A, et al. *Risk factors contributing to fracture non-unions*. Injury 2007;(Suppl 2):S11-8.
- Calori GM, Phillips M, Jeetle S, et al. *Classification of non-union: need for a new scoring system?* Injury 2008;(Suppl 2):S59-63.
- Calori GM, Tagliabue L, Colombo M, et al. *Pseudoartrosi e perdite di sostanza*. GIOT 2010;36:183-9.
- Slater M, Patava J, Kingham K, et al. *Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity*. J Orthop Res 1995;3:655-9.
- Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. *The role of growth factors in the repair of bone*. J Bone Joint Surg Am 2002;84-A:1032-44.
- Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al. *Identification of transforming growth factor family members present in bone inductive protein purified from bovine bone*. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:9843-7.
- Wozney JM. *The bone morphogenetic protein family and osteogenesis*. Mol Reprod Devel 1992;32:160-7.
- EMA. *European Public Assessment Report*. Procedure: n. EMA/H/C/293, 2000.
- Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. *Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial non-unions*. J Bone Joint Surg 2001;(Suppl 1 - part 2):S151-8.
- Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, et al. *Application of BMP-7 to tibial nonunions: A 3-year multicenter experience*. Injury 2008;(Suppl 2):S83-90.
- Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, et al. *Application of BMP-7 to tibial nonunions: A 3-year multicenter experience*. Injury 2008;(Suppl 2):S83-90.
- Gupta AR, Shah NR, Patel TC, et al. *Perioperative and long-term complications of iliac crest bone graft harvesting for spinal surgery: a quantitative review of the literature*. Intern Med J 2001;8:163-6.
- Goulet JA, Senunas LE, DeSilva GL, et al. *Autogenous iliac crest bone graft - complications and functional assessment*. Clin Orthop Relat Res 1997;339:75-81.
- Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. *Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of our hundred and fifty patients*. J Bone Joint Surg Am 2002;84A:2123-34.
- Burkus JK, Sandhu HS, Gornet MF, et al. *Use of rhBMP-2 in combination with structural cortical allografts: clinical and radiographic outcomes in anterior lumbar spinal surgery*. J Bone Joint Surg Am 2005;87:1205-12.
- De Long WG, Einhorn TA, Koval K, et al. *Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis*. J Bone Joint Surg Am 2007;89:649-58.
- Dinopoulos H, Giannoudis PV. *The use of bone morphogenetic proteins (BMPs) in long-bone non-unions*. Curr Orthop 2007;21:268-79.
- Chen D, Zhao M, Mundy GR. *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors 2004;22:233-41.
- Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. *The role of growth factors in the repair of bone*. J Bone Joint Surg Am 2002;84-A:1032-44.
- Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. *The role of growth factors in the repair of bone*. J Bone Joint Surg Am 2002;84-A:1032-44.
- Marx RE. *Platelet Rich Plasma: evidence to support its use*. J Oral Maxillofac Surg 2004;62:489-96.
- Fennis JPM, Stoelinga PJW, Jansen JA. *Mandibular reconstruction: a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma*. J Oral Maxillofac Surg 2002;31:281-6.
- Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. *Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion*. Bone 1999;2:47-50L.
- Roldan JC, Jepsen S, Miller J, et al. *Bone formation in the presence of PRP vs BMP7*. Bone 2004;34:80-90.
- Carreon LY, Glassman SD, Anekstein Y, et al. *Platelet gel (AGFs) fails to enhance fusion rates in instrumented posterolateral fusion*. Spine 2005;30:243-6.
- Weiner BK, Walker M. *Efficacy of autologous growth factors in lumbar intertransverse fusions*. Spine 2003;28:1968-71.
- Calori GM, Tagliabue L, Gala L, et al. *Application of rhBMP-7 and platelet-rich plasma in the treatment of long bone non-unions: a prospective randomized clinical study on 120 patients*. Injury 2008;39:1391-402.
- Pountos I, Corscadden D, Emery P, et al. *Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application*. Injury 2007;(Suppl 4):S23-33.
- Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP. *Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect*. Tissue Engineer 1997;3:173-85.
- Connolly JF. *Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis*. Clin Orthop Relat Res 1998;(Suppl):S257-66.
- Hamanishi C, Yoshii T, Totani Y, et al. *Bone mineral density of lengthened rabbit tibia is enhanced by transplantation of fresh autologous bone marrow cells*. Clin Orthop 1994;303:250-5.

- ³² Muschler GF, Boehm C, Easley K. *Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume.* J Bone Joint Surg Am 1997;79:1699-709.
- ³³ Cummine J, Armstrong L, Nade S. *Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation.* Acta Orthop 1983;54:235-41.
- ³⁴ Sharma S, Garg NK, Veliath AJ, et al. *Per-cutaneous bone-marrow grafting of osteotomies and bony defects in rabbits.* Acta Orthop Scand 1992;63:166-9.
- ³⁵ Weiner BK, Walker M. *Efficacy of autologous growth factors in lumbar intertransverse fusions.* Spine 2003;28:1968-71.
- ³⁶ Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, et al. *Per-cutaneous autologous bone marrow grafting for non-unions. Influence of the number and concentration of progenitor cells.* J Bone Joint Surg Am 2005;87:1430-7.
- ³⁷ Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, et al. *Per-cutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique.* J Bone Joint Surg Am 2006;(Suppl 1):322-7.
- ³⁸ Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, et al. *Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation.* J Bone Miner Metab 1999;17:171-7.
- ³⁹ Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, et al. *Age and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors.* J Orthop Res 2001;19:117-25.
- ⁴⁰ Muschler GF, Boehm C, Easley K. *Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume.* J Bone Joint Surg Am 1997;79:1699-709.
- ⁴¹ Bidula J, Boehm C, Powell K, et al. *Osteogenic progenitors in bone marrow aspirates from smokers and nonsmokers.* Clin Orthop Relat Res 2006;442:252-9.
- ⁴² Saito A, Suzuki Y, Ogata SI, et al. *Accelerated bone repair with the use of a synthetic BMP-2-derived peptide and bone-marrow stromal cells.* J Biomed Mater Res 2005;72:77-82.
- ⁴³ Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH. *The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study.* J Bone Joint Surg Am 1984;66:274-9.
- ⁴⁴ Drosos GI, Kazakos KI, Kouzoumpasis P, et al. *Safety and efficacy of commercially available demineralised bone matrix preparations: a critical review of clinical studies.* Injury 2007;(Suppl 4):S13-21.
- ⁴⁵ Bae HW, Zhao L, Kanim LE. *Intervariability and intravariability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products.* Spine 2006;31:1299-306.
- ⁴⁶ De Long WG, Einhorn TA, Koval K, et al. *Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis.* J Bone Joint Surg Am 2007;89:649-58.
- ⁴⁷ Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, et al. *The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence.* BMC Med 2012;10:81.
- ⁴⁸ Calori G.M., Giannoudis P. *Enhancement of fracture healing with the diamond concept: The role of the biological chamber.* Injury, Int J Care Injured 2011;42:1191-3.
- ⁴⁹ Zimmermann G, Schmeckenbecher KHK, Boeuf S, et al. *Differential gene expression analysis in fracture callus of patients with regular and failed bone healing.* Injury, Int J Care Injured 2012;43:347-56.
- ⁵⁰ Dimitriou R, Kanakaris N, Soucacos PN, et al. *Genetic predisposition to non-union: Evidence today.* Injury, Int J Care Injured 2013;44:S1,S50-53.
- ⁵¹ Evans CH. *Gene delivery to bone.* Adv Drug Deliv Rev 2012;64:1331-40.
- ⁵² Ashman O, Phillips AM. *Treatment of non-unions with bone defects: Which option and why?* Injury, Int J Care Injured 2013;44:S1,S43-45.
- ⁵³ Kimelman-Bleich N, Pelled G, Zilberman Y, et al. *Targeted gene-and-host progenitor cell therapy for nonunion bone fracture repair.* Mol Ther 2011;19:53-59.