



Giorgio Maria Calori * (foto)
Massimiliano Colombo
Miguel Buccì
Piero Fadigati
Simone Mazzola
Carlo Francesco Minoli
Tazio Talamonti
Emilio Mazza

* *Presidente European Society of Tissue Regeneration in Orthopaedics and Traumatology*
COR, Istituto Ortopedico G. Pini,
Università degli Studi di Milano

Indirizzo per la corrispondenza:

Giorgio Maria Calori
Reperto di Chirurgia Ortopedica
Riparativa, Istituto Ortopedico G. Pini,
Università degli Studi di Milano
p.za Cardinal Ferrari 1, 20122 Milano
Tel. + 39 02 58296904
Fax + 39 02 58296905
E-mail: gmc@studiodicalori.it

“What’s new” nelle biotecnologie per il trattamento della pseudoartrosi

*What’s new about biotechnologies in the treatment
of non unions*

Parole chiave: pseudoartrosi, difetti ossei, fattori di crescita, cellule mesenchimali, scaffold, sostituti ossei, innesto osseo autologo, BMP, politerapia, camera biologica

Key words: non union, bone defects, growth factors, mesenchymal cells, scaffold, bone substitutes, autologous bone graft, BMP, polytherapy, biological chamber

Introduzione

Scopo di questo “update” è di presentare le ultime innovazioni biotecnologiche nel campo dell’Ortopedia e della Traumatologia finalizzate al trattamento delle pseudoartrosi. Le nostre conoscenze circa gli specifici eventi molecolari alla base della guarigione ossea sono rapidamente cresciute negli ultimi anni. Il concetto a “diamante”¹ ci ha chiarito che il processo di rigenerazione ossea ha bisogno di alcuni elementi indispensabili: un ambiente meccanico stabile (osteosintesi), le cellule (osteogenesi), i fattori di crescita (GF - osteoinduzione), gli scaffold (osteoconduzione) e ultimo ma non meno importante, la vascolarizzazione, che è stata inclusa con l’introduzione del concetto del “pentagono”². Abbiamo esaminato tutti gli agenti coadiuvanti che possono essere usati al giorno d’oggi a sostegno della rigenerazione ossea: proteine umane ricombinanti, diversi tipi di scaffold, la matrice ossea demineralizzata (DBM), il plasma arricchito di piastrine (PRP) e il trapianto autologo di cellule mesenchimali stromali (MSC). Essi possono essere usati da soli (monoterapia) o in associazione tra loro. Questa nuova strategia di trattamento, detta politerapia³⁻⁵, richiede un ambiente specifico che noi chiamiamo la “Camera Biologica”⁶. L’utilizzo della medicina rigenerativa nella riparazione dell’osso sembra dare i risultati migliori ma, nel tentativo di evitare sprechi economici, è importante avere un algoritmo di trattamento in base al tipo di pseudoartrosi o perdita di sostanza, in relazione alla sede anatomica interessata.

Secondo vari studi in letteratura si stima che dal 5 al 10% delle fratture siano associate a guarigione compromessa, da ritardo di saldatura o da pseudoartrosi^{7,8}. Oggi sono disponibili numerose soluzioni alternative all’utilizzo di un innesto osseo autologo (ABG), anche se questo rimane ancora un “gold standard” come opzione di trattamento. Ciò è dovuto al fatto che molti medici esperti abbiano spostato il loro approccio da un concetto di medicina riparativa ad un concetto di medicina rigenerativa. Anche se trattamenti standard come osteogenesi distrazionale, ABG, trapianto di fibula vascolarizzata e altri restano comunque buone opzioni, possono essere superati da una più ampia visione di trattamento del paziente e il concetto “Diamante/ Pentagono” è la massima espressione di questo cambiamento radicale^{1,2}.

Il primo passo per pianificare un corretto trattamento di pseudoartrosi e perdite di sostanza ossee è quello di impostarne una definizione ed una corretta classificazione che possano aiutare i chirurghi nella scelta della tecnica chirurgica e nello scegliere se e quali biotecnologie applicare.

Definizione e classificazione

Si può definire pseudoartrosi una frattura che non raggiunge la guarigione in 9 mesi dal primo trattamento o di una situazione patologica in cui non si può raggiungere l'unione ossea senza un corretto stimolo esterno. La perdita ossea può essere causata da un'ampia resezione a livello del sito chirurgico di una pseudoartrosi, dall'asportazione di una massa tumorale, dal debridement di tessuto settico o a causa del trauma stesso ⁹.

Numerose classificazioni di pseudoartrosi sono state proposte nel corso degli anni, ma quella maggiormente considerata attualmente nell'approccio scientifico è la classificazione di Weber-Cech che definisce le pseudoartrosi in rapporto alla reazione ossea in seguito al trattamento, che può essere suddivisa in: atrofica, oligotrofica e ipertrofica ¹⁰. Il suo limite è di valutare solo l'aspetto radiografico della lesione, senza considerare tutte le caratteristiche ambientali e biologiche dei diversi pazienti, informazioni fondamentali per il chirurgo al fine di decidere un corretto trattamento.

La strategia terapeutica non può non considerare i vari fattori di rischio presenti in ogni situazione e legati essenzialmente alle condizioni del paziente. Essi possono essere suddivisi in fattori generali, quali: sesso, età, dieta, diabete, osteoporosi, fumo, alcool e terapia con FANS o cortisonici; o fattori di rischio locali quali le caratteristiche della frattura, il tipo di frattura, l'esposizione, l'infezione e la presenza di fratture multiple ⁷.

Per tutti questi motivi abbiamo proposto un nuovo sistema di classificazione: il *Non Union Scoring System* (NUSS), che tiene in considerazione tutte queste variabili fornendo un punteggio finale da 0 a 100 punti.

Il vero vantaggio del NUSS è che ha permesso al chirurgo di omogeneizzare diversi tipi di pseudoartrosi utilizzando un sistema di valutazione che stabilisce un punteggio numerico al fine di guidare il chirurgo verso l'opzione di trattamento più corretta. Il punteggio consente inoltre di identificare 4 gruppi di trattamento a complessità crescente.

- 1° gruppo con punteggio 0/25, costituisce un problema di tipo prevalentemente meccanico; il trattamento indicato è necessariamente la stabilizzazione del focolaio, ottimizzando ovvero modificando il sistema di osteosintesi.
- 2° gruppo con punteggio 26/50, costituisce un problema di tipo sia biologico che meccanico; il trattamento richiede correzione della sintesi e stimolazione biologica del focolaio, ottenuta con l'ausilio di mezzi fisici (campi magnetici elettro-pulsati – CEMP, onde d'urto extracorporee – ESWT).
- 3° gruppo con punteggio 51/75. È un problema complesso caratterizzato da estrema gravità sia delle condizioni biologiche che meccaniche. È quasi sempre ri-

chiesta la resezione del focolaio e quindi presente una perdita di sostanza ossea che deve essere ripristinata. È questo l'ambito che trova maggiore indicazione per le biotecnologie.

- 4° gruppo con punteggio 76/100. Sono pseudoartrosi di tale gravità da essere assimilate ad un problema pressoché irrisolvibile e che pertanto possono richiedere una amputazione attuale primaria o il sacrificio (artrodesi o protesi) del segmento interessato ¹¹.

La medicina rigenerativa viene applicata nella maggior parte di casi nel terzo gruppo, in cui è spesso presente un difetto osseo critico e dove l'ingegneria tissutale e le biotecnologie possono trovare le più ampie applicazioni.

Ingegneria tissutale e politerapia

Il Concetto di Diamante rappresenta un quadro di quali parametri e quali co-fattori un medico deve contemplare per l'ottimizzazione del processo di riparazione ossea ¹.

L'ingegneria tissutale ci fornisce numerosi agenti per rispettare tale concetto, quali scaffold (allogenici, xenogenici, matrice ossea demineralizzata, sostituti ossei sintetici), cellule mesenchimali stromali autologhe e fattori di crescita (rh-BMP e PRP).

Scaffold

Gli scaffold possono essere organici, come in caso degli autotrapianti e degli xenotrapianti, o sostituti ossei sintetici come idrossiapatite (HA), tricalciofosfato (TCP) ed il calcio solfato bifasico (HA + TCP) che hanno proprietà osteoconduttive, ma non capacità osteoinduttiva, con alcuni svantaggi nell'uso singolo: lungo tempo necessario per il riassorbimento e la sostituzione completa di nuovo tessuto osseo, inadeguatezza nel trattamento di grandi perdite di sostanza ossea e scarsa efficacia nel trattamento delle pseudoartrosi atrofiche ^{12 13}. Un altro scaffold organico, derivato dalle ossa lunghe umane, è la matrice ossea demineralizzata (DBM) che possiede un potenziale osteogenico dovuto alla presenza di BMP e di altri fattori, come il "transforming growth factor beta" (TGF- β), insulin-like growth factor (IGF) ¹⁴, ma una capacità osteoinduttiva inferiore rispetto all'ABG e presenta una discutibile variabilità di concentrazione di BMP-2 e BMP-7 in alcuni prodotti sul mercato ¹⁵.

Cellule mesenchimali stromali

Le cellule mesenchimali stromali (MSC) sono presenti nel midollo osseo dei pazienti. Esse sono considerati le cellule progenitrici osteogeniche, con dimostrata capacità di riparare i difetti ossei ^{16 17}. Possono essere utilizzate per arricchire uno scaffold o direttamente impiantate nel sito di pseudoartrosi. La loro efficacia è direttamente legata

alla loro concentrazione ed è stato dimostrato che si deve avere almeno una concentrazione 3X o 4X per ottenere una capacità di rigenerazione ossea. Per questo motivo gli scienziati hanno cercato di espandere la loro cultura in una linea indifferenziata, ma l'isolamento e la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali in vitro richiede tempo, lavoro e costi significativi¹⁸.

Così, di recente, con le nuove tecniche che si sono rese disponibili, le MSC possono essere raccolte dal midollo osseo della cresta iliaca e concentrate mediante un processo di centrifugazione o con processi di filtrazione. Entrambe queste procedure possono essere eseguite direttamente in sala operatoria. Gli studi di P. Hernigou hanno sottolineato l'influenza del numero e della concentrazione delle cellule progenitrici come fattore chiave per determinare la guarigione^{19 20}.

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 mitogenetico²¹.

I fattori di crescita contenuti nel PRP sono: promotori della divisione cellulare (mitogenesi) ma non specifici per le cellule ossee e non sono in grado di promuovere la differenziazione delle cellule mesenchimali unicamente verso la linea osteogenetica e di indurre la formazione di nuovo tessuto osseo²². Non sembrano essere molto utili quando usati singolarmente o con scaffold nel trattamento di pseudoartrosi delle ossa lunghe e meno utili se confrontate con rhBMP-7²³.

Rh-BMPs

È stato dimostrato ormai, già dalla metà degli anni '90, 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 lesione²⁴. 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 BMP. Sebbene siano state individuate almeno 40 diverse rhBMP, una chiara dimostrazione clinica del potenziale osteoinduttivo è disponibile a oggi solo per la rhBMP-7,

detta anche osteogenic protein-1 (OP-1), e la rhBMP-2²¹ appartenenti alla famiglia dei *transforming growth factors* TGF-β i cui recettori sono espressi su condrociti e osteoblasti²⁵. Il fenomeno dell'osteoiduzione è caratterizzato dalla trasformazione delle cellule mesenchimali perivascolari in cellule osteoprogenitrici in grado di rigenerare tessuto osseo²⁴.

L'applicazione prima pre-clinica e poi su umano è ormai consolidata ed ha portato, in vari studi, percentuali di successo tra l'85% e l'89% con abbattimento altresì di tutte le complicazioni arrecate dall'uso nel passato consolidato di osso autologo. Dunque studi originali e trial internazionali (di livello 1) hanno dimostrato l'efficacia delle BMP-7 nella guarigione delle pseudoartrosi e la loro capacità osteoinduttiva pari e a volte superiore all'innesto di osso autoplastico^{23, 26-36}.

Nonostante la monoterapia sia un approccio scientifico corretto, l'impianto di un singolo agente ha mostrato un tasso di successo che non sempre hanno raggiunto livelli prossimi al 100%^{23 26-36}. La politerapia è la strategia di effettuare l'impianto contemporaneo di tutti i componenti fondamentali del Diamond/Pentagon Concept^{1 2}. L'adozione di questa strategia sembra essere un percorso logico per condurre ad un tasso di successo costantemente superiore³⁻⁵.

Camera biologica

Se le cellule, scaffold e fattori di crescita sono gli elementi da fornire al fine di ottenere la rigenerazione ossea, come possiamo creare le migliori condizioni in cui questi elementi possano lavorare insieme con l'apporto di sangue necessario? Dobbiamo creare una "Camera biologica": un "bio-reattore", dove il processo di rigenerazione ossea possa avvenire⁶.

Quali dovrebbero essere le proprietà della "Camera biologica"? Non ci sono dubbi circa il primo requisito: la vascolarizzazione. Un supporto vascolare corretto può portare al trasporto e scambio di ossigeno, nutrienti, molecole di segnale e alla migrazione delle cellule osteoprogenitrici³⁷. Dobbiamo poi ricordare che deve essere asettica per evitare infezioni e meccanicamente stabile. Un altro punto importante da considerare è che la camera biologica dovrebbe funzionare come un compartimento chiuso, parzialmente aperto o completamente aperto in relazione ai tessuti circostanti. Infatti dovrebbe essere chiuso per migliorare il contenimento degli elementi che il chirurgo ha impiantato, d'altra parte, dovrebbe essere aperto per ricevere tutti gli elementi nutritivi e i segnali dall'ambiente circostante. Quindi la camera biologica deve avere una permeabilità selettiva, per permettere l'ingresso solo degli elementi necessari ed evitare la dispersione di materiali utili.

Ma, prima di tutto, come possiamo creare la camera bio-

logica? Dobbiamo eseguire un'ampia cruentazione e debridement del tessuto patologico, una resezione in blocco, se necessario, per raggiungere osso sanguinante e vitale. Successivamente dobbiamo fornire una fissazione stabile del sito di pseudoartrosi ed un impianto simultaneo di tutti gli elementi (scaffold, cellule, GF) provenienti dal concetto del Pentagono per realizzare una politerapia al fine di migliorare il processo di rigenerazione ossea e portare alla guarigione della frattura. La "camera biologica", rappresenta quindi un vero e proprio bioreattore capace di massimizzare gli effetti conseguenti alle biotecnologie utilizzate.

Conclusioni

Le condizioni del paziente, il segmento scheletrico coinvolto, le dimensioni e la posizione del difetto osseo, sono in grado di determinare la scelta del trattamento che potrebbe essere utilizzato. Il NUSS è il sistema di punteggio che dovrebbe aiutare il chirurgo nel modo corretto durante il processo decisionale³⁸.

Studi futuri dovrebbero prendere in considerazione tutti i parametri che, oggi, sono sconosciuti. Per quanto riguarda l'applicazione di MSC deve essere studiato un ampio numero di variabili: i tempi di impianto cellulare, il tipo di cellule (differenziate o indifferenziate), il dosaggio ed il trasportatore, la combinazione dello scaffold con fattori di crescita, lo scaffold ottimale e il tipo di carrier per le molecole osteoinduttive³⁹⁻⁴¹. Per quanto riguarda l'applicazione dei fattori di crescita, sono stati condotti molti studi e il loro uso sembra essere sicuro e utile con un livello I di evidenza.

Per migliorare il processo decisionale su quale trattamento debba essere usato per ripristinare adeguatamente grandi difetti ossei, sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere meglio l'uso delle biotecnologie precedentemente citate. Ulteriori evidenze scientifiche di livello I sono necessarie al fine di affermare in modo adeguato l'efficacia clinica. Il trattamento delle pseudoartrosi delle ossa lunghe e dei difetti ossei critici continua ad essere una sfida per il traumatologo con frequenti risultati insoddisfacenti e lunga morbilità. Tecniche classiche mediante trapianto autologo, allungamenti con fissatori esterni, artrodesi, protesizzazione ed amputazione sono ancora validi ausili nel trattamento delle gravi perdite di sostanza ossea, la "camera biologica" può essere proposta come alternativa assai incoraggiante. I buoni risultati clinici e radiografici, l'ottima compliance del paziente e soprattutto gli strabilianti fenomeni rigenerativi che tale metodica sta dimostrando sono molto interessanti e saranno fonte di nuovi studi. Il concetto di "camera biologica" posizionato al centro del "concetto di diamante" consente al medico di valutare in modo più completo l'ambiente molecolare circostante. Esso fornisce lo stimolo per visualizzare e analizzare in

modo più completo quali dovrebbero essere le caratteristiche di questo bioreattore in situ.

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 *carrier*^{42 43} sia con l'utilizzo di altri *carrier* non virali come ad esempio particolari campi elettrici pulsati (*DNA electroporation*)⁴⁴. 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.

Come patologia deve essere quindi compresa, analizzata, classificata e quindi trattata correttamente sia sotto il profilo chirurgico che biologico.

Bibliografia

- 1 Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. *Fracture healing: the diamond concept*. *Injury* 2007;38(Suppl. 4):S3-6.
- 2 Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, et al. *The diamond concept: open questions*. *Injury* 2008;39(Suppl.2):S5-8.
- 3 Calori GM, Mazza E, Colombo M, et al. *Treatment of long bone non-unions with polytherapy: indications and clinical results*. *Injury* 2011;42:587-90.
- 4 Calori GM, Colombo M, Ripamonti C, et al. *Polytherapy in bone regeneration: clinical applications and preliminary considerations*. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011;24(1 S2):85-9.
- 5 Calori GM, Colombo M, Mazza E, et al. *Monotherapy vs. polytherapy in the treatment of forearm non-unions and bone defects*. *Injury Int J Care Injured* 2013;44(S1):S63-9.
- 6 Calori GM, Giannoudis PV. *Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber*. *Injury* 2011;42:1191-3.
- 7 Calori GM, Albisetti W, Agus A, et al. *Risk factors contributing to fracture nonunions*. *Injury* 2007;38(Suppl.2):S11-18.
- 8 Tzioupis C, Giannoudis PV. *Prevalence of long-bone non-unions*. *Injury* 2007;38(Suppl.2):S3-9.
- 9 Calori GM, Tagliabue L, Colombo M, et al. *Pseudoartrosi e perdite di sostanza*. *GIOT* 2010;36:183-9.

- ¹⁰ Weber BG, Cech O. *Pseudarthrosis*. New York: Grune and Stratton 1976.
- ¹¹ Calori GM, Phillips M, Jeetle S, et al. *Classification of non-union: need for a new scoring system?* Injury 2008;39(Suppl.2):S59-63.
- 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.
- ¹³ Calori GM, Mazza E, Colombo M, et al. *The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs?* Injury 2011;42(Suppl.2):S56-S63.
- ¹⁴ Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, et al. *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.
- ¹⁵ Bae HW, Zhao L, Kanim LE, et al. *Intervariability and intravariability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products*. Spine 2006;31:1299-306.
- ¹⁷ Papathanasopoulos A, Giannoudis PV. *Biological considerations of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells*. Injury 2008;39(Suppl.2):S21-32.
- ¹⁸ Connolly JF. *Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis*. Clinical Orthop Relat Res 1998;355S:257-66.
- ¹⁹ Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, et al. *Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique*. J Bone Joint Surg Am 2006;88(Suppl.1 - Pt2):322-7.
- ²⁰ Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, et al. *Percutaneous 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.
- ²¹ 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.
- ²² Weiner BK, Walker M. *Efficacy of autologous growth factors in lumbar intertransverse fusions*. Spine 2003;28:1968-70.
- ²³ 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.
- ²⁴ Wozney JM. *The bone morphogenetic protein family and osteogenesis*. Mol Reprod Devel 1992;32:160-7.
- ²⁵ 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.
- ²⁶ Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. *Osteogenic Protein-1 (BMP-7) in the treatment of tibial nonunions*. J Bone Joint Surg Am 2001;83(Suppl.1):S151-8.
- ²⁷ 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 four hundred and fifty patients*. J Bone Joint Surg Am 2002;84A:2123-34.
- ²⁸ 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.
- ²⁹ Dinopoulos H, Giannoudis PV. (iv) *The use of bone morphogenetic proteins (BMPs) in long-bone non-unions*. Curr Orthopaed 2007;21:268-79.
- ³⁰ Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, et al. *Application of BMP-7 to tibial nonunions: a 3-year multicenter experience*. Injury 2008;39(Suppl.2):S83-90.
- ³¹ Giannoudis PV, Tzioupis C. *Clinical applications of BMP-7. The UK perspective*. Injury 2005;36S:S47-50.
- ³² Ronga M, Baldo F, Zappalà G, et al. *Recombinant human bone morphogenetic protein-7 for treatment of long bone non-union: an observational, retrospective, non-randomized study of 105 patients*. Injury 2006;37(Suppl.3):51-56.
- ³³ Dimitriou R, Dahabreh Z, Katsoulis E, et al. *Application of recombinant BMP-7 on persistent upper and lower limb non-unions*. Injury 2005;36S:S51-9.
- ³⁴ Mc Kee MD. *Recombinant human bone morphogenetic protein-7: applications for clinical trauma*. J Orthop Trauma 2005;19(Suppl.10):S26-8.
- ³⁵ Zimmermann G, Wagner C, Schmeckenbecher K, et al. *Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft*. Injury 2009;40(Suppl. 3):S50-3.
- ³⁶ Kanakaris NK, Lasanianos N, Calori GM, et al. *Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: a 4-year multicentre experience*. Injury 2009;S3:S54-60.
- ³⁷ Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, et al. *Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF*. Injury 2008;39(S2):S45-57.
- ³⁸ Calori GM, Tagliabue L, Colombo M, et al. *Pseudoartrosi e perdita di sostanza*. GIOT 2010;36:183-9.
- ³⁹ Calori GM, Donati D, Di Bella C, et al. *Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions*. Injury 2009;40(Suppl.3):S67-76.
- ⁴⁰ Giannoudis PV, Kanakaris NK, Einhorn TA. *Interaction of bone morphogenetic proteins with cells of the osteoclast lineage: review of the existing evidence*. Osteoporos Int 2007;18:1565-81.
- ⁴¹ Uludag H, Gao T, Porter TJ, et al. *Delivery systems for BMPs: factors contributing to protein retention at an application site*. J Bone Joint Surg Am 2001;83(Suppl.1 - Pt 2):S128-35.
- ⁴² Evans CH. *Gene delivery to bone*. Adv Drug Deliv Rev 2012;64:1331-40.
- ⁴³ Ashman O, Phillips AM. *Treatment of non-unions with bone defects: which option and why?* Injury, Int J Care Injured 2013;44(S1):S43-5.
- ⁴⁴ Kimelman-Bleich N, Pelled G, Zilberman Y, et al. *Targeted gene-and-host progenitor cell therapy for nonunion bone fracture repair*. Mol Ther 2011;19:53-9.