

# Promoción de la regeneración ósea por ultrasonido pulsado de baja intensidad

O. Rodríguez

Instituto de Cibernética, Matemática y Física, Departamento de Física Aplicada  
La Habana, Cuba  
reyrua@yahoo.com

**Resumen**— Este trabajo muestra una exploración del conocimiento sobre la eficacia de una estimulación con ultrasonido pulsado de baja intensidad para promover la regeneración del tejido óseo y de los mecanismos de acción de la intervención. Desde un punto de vista clínico se concluye que cuando el criterio de la curación es radiológico, la estimulación ultrasónica es efectiva para acelerar la curación de fracturas agudas. Adicionalmente, la evidencia ofrecida por numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* indica diversos mecanismos de acción del ultrasonido que pueden ser paralelados acertadamente con el incremento de la reparación ósea asistida ultrasónicamente. Finalmente, estas ondas acústicas están mostrando su capacidad para mejorar resultados conseguidos en la promoción de la regeneración ósea mediante procedimientos de la ingeniería de tejidos.

**Palabras clave**— Fractura ósea, ingeniería de tejidos, LIPUS, regeneración ósea, ultrasonido

## I. INTRODUCCIÓN

Millones de fracturas óseas ocurren globalmente cada año constituyendo un verdadero problema de salud humana. En este escenario, el manejo clínico de la fractura continúa siendo un reto médico y socioeconómico. Primeramente, las fracturas simples requieren por lo menos 6-8 semanas para curar y el tiempo para restaurar completamente la capacidad funcional del hueso fracturado puede extenderse varias semanas más. Otros tipos de fracturas pueden requerir meses para su recuperación [1]. Adicionalmente, de las estimadas 7.9 millones de fracturas que acontecen cada año solamente en los Estados Unidos, 5-10% degeneran finalmente en uniones demoradas o no-uniones [2].

Consecuentemente, intensos esfuerzos de investigación han sido realizados con el objetivo de definir estrategias de tratamiento dirigidas a estimular la regeneración del tejido óseo. Entre los métodos se incluyen la “regla de oro” consistente en el injerto óseo autólogo y fijación interna o externa, el uso de células madres y de factores de crecimiento y la terapia génica. Otras aproximaciones han sido proyectadas con el uso de una estimulación física de la fractura entre las que se encuentran ondas de choque extracorpóreas, campos electromagnéticos y ultrasonidos [3], [4].

En 1994 la FDA (entidad reguladora, Estados Unidos) aprobó el uso de una señal de ultrasonido pulsado de baja intensidad o LIPUS por sus siglas en inglés (*low-intensity pulsed ultrasound*) para acelerar la curación de fracturas frescas manejadas conservadoramente y en el 2000 dio igual aprobación para el tratamiento de las no-uniones bien

establecidas [5]. En el 2010, el NICE (entidad reguladora, UK) indicó que la tecnología LIPUS representa una opción de tratamiento segura y eficaz para reducir el tiempo de curación en pacientes con fracturas óseas, ofreciendo beneficios clínicos notables particularmente en circunstancias de una curación demorada y en no-uniones [6]. Sin embargo, más recientemente han sido publicadas consideraciones adicionales en cuanto a la evaluación de la terapia ultrasónica [7], [8].

El objetivo del presente trabajo es mostrar una exploración del conocimiento sobre la eficacia de una estimulación con LIPUS para promover la regeneración ósea y de los mecanismos de acción reportados para esta intervención física.

Con respecto al impacto clínico de la terapia fueron utilizados como fuente de información primaria los más recientes *reviews*. Otros ensayos clínicos no contenidos en éstos también fueron analizados. La búsqueda se efectuó en las bases electrónicas de datos MEDLINE y LILACS en los idiomas inglés y español, hasta marzo de 2016. El criterio de selección de los ensayos fue aquellos aleatorios o cuasi-aleatorios donde la estimulación ultrasónica se le aplicó a un grupo activo mientras se mantuvo a otro como control, en pacientes mayores de 18 años afectados de fracturas agudas. No se consideraron otras fracturas en el ánimo de simplificar el trabajo.

Adicionalmente, fueron revisados los mecanismos de acción de la intervención ultrasónica donde se incluyó estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Finalmente, se abordó la factibilidad del uso de estas ondas acústicas para mejorar resultados conseguidos en la promoción de la regeneración ósea mediante procedimientos de la ingeniería de tejidos.

## II. ELEMENTOS DE LA INTERACCIÓN DEL HUESO CON SU ENTORNO MECÁNICO

El hueso es un tejido biológico dinámico compuesto por células metabólicamente activas e integradas en una estructura rígida compleja. El tejido se encuentra en un proceso continuo de remodelación, generando cambios en su masa y morfología para un soporte eficiente de las cargas mecánicas que le son aplicadas por su entorno funcional. Esta capacidad del hueso de reestructurarse mecánicamente es referida generalmente como la ley de Wolff. La ley asume que el esfuerzo mecánico actúa como una señal que controla el proceso de remodelación ósea [9], [10].

Prácticamente todas las células son mecánico-sensitivas, incluyendo miocitos, plaquetas, células del endotelio,

condrocitos, fibroblastos y células óseas. No obstante, el esquema completo de transducción en el hueso que relaciona las fuerzas mecánicas con las respuestas biológicas inducidas, permanece aún pendiente por dilucidar. Lo que sí es bien conocido es que múltiples tipos de células óseas y sus precursores trabajan de forma concertada tanto espacial como temporalmente para controlar la modelación y remodelación del hueso. La habilidad de este tejido para detectar y responder a las fuerzas mecánicas es orquestada por lo menos por cuatro tipos de células: osteoclastos, osteoblastos, osteocitos y células osteo-progenitoras originadas de células madres mesenquimales (*mesenchymal stem cells*, MSCs). Además, existe una acumulación creciente de evidencias de un rol funcional de las conexiones existentes entre los osteocitos para detectar la necesidad y la dirección de los sitios de formación de hueso nuevo [11].

Diferentes teorías han sido formuladas con el objetivo de explicar la dependencia entre el estímulo mecánico y el desarrollo del hueso, aspecto fundamental en un esquema de adaptación evolutiva de los organismos vertebrados. En este sentido, varios modelos tanto analíticos como empíricos han postulado durante las últimas décadas, que la magnitud del esfuerzo, la razón del esfuerzo, las corrientes electrocinéticas, las corrientes piezoeléctricas, el flujo de cizalladura de líquidos, la densidad de energía del esfuerzo y el gradiente del esfuerzo, son todos importantes en la definición del esqueleto [10].

## II. EFECTOS FÍSICOS, MOLECULARES Y CELULARES INDUCIDOS POR EL ULTRASONIDO

Diferentes mecanismos físicos de acción y numerosos efectos moleculares y celulares producidos por el ultrasonido han sido paralelados con el proceso de reparación ósea [12]. Aunque el proceso detallado por el cual el ultrasonido estimula la curación del hueso permanece aún por ser descrito completamente, un entendimiento básico de la interacción de esta intervención mecánica con el entorno de la fractura resulta esencial en el estudio de esta terapia.

El ultrasonido es una onda acústica a frecuencias por encima de 20 kHz. Es por lo tanto una forma de energía mecánica que puede ser transmitida al medio biológico no invasivamente. Los mecanismos físicos de acción del ultrasonido en este medio son usualmente agrupados en aquellos originados predominantemente por un efecto térmico o por un efecto mecánico. Adicionalmente, los mecanismos de acción mecánicos son clasificados frecuentemente por su origen como cavitacionales y no cavitacionales [13]. Este esquema aunque simplificado, puede efectivamente ayudar a comprender los fenómenos a estudiar.

En su propagación por el tejido biológico el ultrasonido es atenuado por los fenómenos de absorción, dispersión (*scattering*) y divergencia geométrica. La dispersión es

entendida como la porción de la energía acústica que simplemente cambia de dirección [14]. La absorción implica finalmente transformación de energía ultrasónica en calor, lo que conduce a un determinado incremento local de la temperatura. El incremento estará determinado por las propiedades del tejido (coeficiente de absorción, conductibilidad térmica y magnitud de la perfusión) y de las características del campo acústico utilizado, incluyendo la intensidad Isata de las ondas acústicas (Isata, *spatial-average, temporal-average intensity*), frecuencia, tiempo de exposición, etc. [14]. La cavitación acústica es la respuesta de una burbuja de gas/vapor o cavidad en un fluido a la tensión acústica. Otros fenómenos de carácter mecánico generados por el ultrasonido en un líquido son el flujo volumétrico (*bulk streaming*), definido como el líquido que fluye dentro y paralelo a las ondas de ultrasonido en propagación, y el denominado micro-flujo (*microstream*) que se genera alrededor de las burbujas en cavitación [14]. Asimismo, pueden provocarse fuerzas de radiación y de cizalladura en un líquido sometido al estrés ultrasónico. En adición, las ondas ultrasónicas producen alteraciones en el tejido sometiéndolo a repetidos esfuerzos y deformaciones micro-mecánicas a altas frecuencias [6], [15].

Como fue mencionado, el desarrollo del hueso es influido por factores mecánicos. Existen crecientes evidencias de que señales mecánicas introducidas no invasivamente en el esqueleto y caracterizadas por una extremada baja amplitud, pero generadas a altas frecuencias, son anabólicas para el hueso [10]. Estas señales pueden ser órdenes de magnitud inferior a las que típicamente se consideran promovidas por los ejercicios físicos vigorosos. La observación indica que en adición a la magnitud de la deformación, el número total de eventos de deformación y el número de eventos por unidad de tiempo, pudieran ser cruciales en la definición de la masa y de la morfología del hueso [10]. Estos elementos revelan que es razonable el establecimiento de una relación entre el estímulo mecánico provocado por el ultrasonido en el hueso y la promoción de la reparación ósea. De tal forma, las micro-deformaciones producidas en el tejido óseo por las ondas acústicas pudieran estar relacionadas con la Ley de Wolff. En dirección a la confirmación de esta idea, un estudio reciente ha reportado que el empleo de una señal LIPUS puede mimetizar el efecto de la carga mecánica funcional en la formación de hueso *in vivo* [16]. En síntesis, es posible que al menos uno de los mecanismos de acción del ultrasonido que estimula la regeneración ósea sea la reproducción de los efectos mecánicos de las cargas funcionales de baja intensidad que resultan anabólicas en el hueso.

Es conocido que un determinado incremento de la temperatura puede generar importantes cambios a nivel celular y del tejido. Diversos estudios han demostrado que el calentamiento producido por la aplicación de una estimulación con LIPUS (Isata 30-50 mWcm<sup>2</sup>) a la fractura produce un incremento no superior a 1°C [17]. Pese a esto, es importante destacar que la bioquímica de la célula es muy

sensible a la temperatura y que pequeños incrementos de ésta pueden afectar significativamente algunas enzimas tales como la metaloproteasa de matriz-1 (MMP-1). De tal forma, la estimulación con LIPUS puede servir como un medio para restablecer o normalizar la temperatura metabólica en el sitio de la fractura en áreas tales como las partes distales de las extremidades, o en regiones donde el flujo sanguíneo se ha visto comprometido. Este efecto aunque discreto puede ser biológicamente importante [5].

Biológicamente, existen diversas sustancias denominadas factores de crecimiento que estimulan e inducen la formación tisular, regulando diversos procesos biológicos a través de interacciones con receptores celulares. Según sea su función predominante, se los divide en mitógenos, mayor influencia sobre la proliferación celular, y morfógenos, mayor influencia en la diferenciación celular [3]. Entre los factores de crecimiento se encuentran el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), el factor de crecimiento insulínico-1 (*insulin-like growth factor*, IGF-1) y el factor transformante del crecimiento de tipo beta (*transforming growth factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ).

Disímiles son las sendas que pueden ser recorridas con la intención de correlacionar la estimulación ultrasónica con la promoción de la curación del hueso fracturado. Con esta intención, diferentes efectos biológicos inducidos por el ultrasonido en el tejido pueden ser paralelos con la estimulación de la curación del hueso, incluyendo aumento de la permeabilidad de la membrana celular [18], estimulación *in vitro* de la síntesis de colágeno en fibroblastos humanos [19], incremento de la concentración intracelular de calcio [20], estimulación a la expresión de genes incluyendo agregan, IGF y TGF- $\beta$  [21], [22], incremento del factor de crecimiento PDGF-AB [23], elevación de los niveles de IGF mRNAs, osteocalcina y sialoproteína mRNAs ósea [24], producción aumentada de PGE2 [25], [26], estimulación de la angiogénesis en el sitio de la fractura [27], [28], mejora a la actividad osteogénica de células periósticas humanas [29], promoción de la diferenciación de células osteogénicas de médula de hueso humano [30] y expresión aumentada del VEGF [31].

Numerosos estudios han atribuido muchos de los fenómenos moleculares y celulares anteriormente relacionados, con los diferentes eventos físicos que pueden ser producidos por el ultrasonido en el tejido biológico. La cavitación estable, el flujo y el micro-flujo acústicos y las fuerzas de radiación han sido involucrados en la afectación de las razones de difusión y de la permeabilidad celular, el aumento de la circulación sanguínea y la expresión de genes [14], [18], [32].

### III. ESTUDIOS CLÍNICOS

Fueron localizados 20 *reviews* así como otros trabajos no relacionados en éstos. En resumen, fueron analizados 14 ensayos clínicos. La información examinada refleja que una estimulación con LIPUS efectivamente acelera de forma significativa la curación radiológica de las fracturas agudas. Este criterio concuerda con un estudio anteriormente realizado [33] y puede ayudar a establecer rangos de efectividad y aplicabilidad de la terapia, basada en una estimulación mecánica de alta frecuencia implementada mediante ondas ultrasónicas.

### IV. POSIBILIDAD DE MEJORAR ULTRASÓNICAMENTE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

La medicina regenerativa, abarcando la ingeniería de tejidos y la génica, así como las terapias implementadas mediante el uso de células madres y de factores de crecimiento, ofrecen significativas oportunidades para estimular la curación del hueso. Por otra parte, como fue mencionado, una estimulación con LIPUS es reportada en numerosos trabajos ser efectiva para obtener la curación de huesos fracturados.

Teniendo en cuenta ambos hechos, un número incipiente de trabajos han sido publicados en los cuales se ha usado una terapia combinada de ultrasonido con procedimientos característicos de la medicina regenerativa.

En un modelo de ratas placebo controlado de defectos femorales tratados con portadores de rhBMP-2 (0, 1  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 6  $\mu$ g, o 12  $\mu$ g; n=30) se estudió el impacto del uso combinado de LIPUS con rhBMP-2 en la formación de hueso. Se determinó que una estimulación con LIPUS y 1,2  $\mu$ g rhBMP-2 aumentó sustancialmente la curación radiológica a partir de las dos semanas. Cuantitativamente, el uso de LIPUS con 1,2  $\mu$ g rhBMP-2 aumentó significativamente el volumen de hueso. Biomecánicamente, el tratamiento con LIPUS aumentó notablemente la torsión pico y la rigidez en el grupo de 6  $\mu$ g rhBMP-2. El trabajo concluye que la estimulación LIPUS aumenta la formación de hueso a dosis bajas de rhBMP-2 (1,2  $\mu$ g y 6  $\mu$ g) y la maduración del callo a dosis de 12  $\mu$ g, en el modelo empleado [34].

LIPUS tiene de igual forma efectos positivos en la viabilidad de condrocitos y de MSCs en cultivos de 3-D, en la diferenciación condrogénica de MSCs *in vitro* e *in vivo* y en la reparación de daños del cartílago *in vivo*. Se sugiere que el uso de LIPUS es un método eficiente y clínicamente aplicable para la ingeniería del cartílago y su reparación [35].

### V. CONCLUSIONES

En general, una estimulación con LIPUS es efectiva para acelerar la curación radiológica de fracturas agudas. Adicionalmente, la evidencia ofrecida por numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* indica diversos mecanismos de

acción del ultrasonido que pueden ser paralelados acertadamente con el incremento de la reparación ósea asistida ultrasónicamente. Finalmente, una intervención física por medio de LIPUS está mostrando su capacidad para mejorar resultados obtenidos en la promoción de la regeneración ósea lograda mediante procedimientos de ingeniería de tejidos.

#### VI. REFERENCIAS

- [1] B. M. Snyder, J. Conley, K. J. Koval, "Does low-intensity pulsed ultrasound reduce time to fracture healing? A meta-analysis," *Am. J. Orthop.*, vol. 41, no. 12, E12-E19, 2012.
- [2] T. A. Einhorn, "Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery," *International Orthopaedics (SICOT)*, vol. 31, pp. 721-727, 2007.
- [3] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, P. Giannousdis, "Bone regeneration: current concepts and future directions," *BMC Medicine*, 9:66, 2011.
- [4] C. L. Romano, D. Romano, N. Logoluso, "Low-intensity pulsed ultrasound for the treatment of bone delayed union or nonunion: a review," *Ultrasound Med. Biol.* vol. 35, pp. 529-36, 2009.
- [5] C. Rubin, M. Bolander, J. P. Ryaby, M. Hadjiargyrou, "The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures," *J. Bone Joint Surg. (Am)*, vol. 83, no. 2, pp. 259-270, 2001.
- [6] <https://www.nice.org.uk/guidance/IPG374> (fecha de consulta: 17/08/2016).
- [7] X. L. Griffin, N. Parsons, L. Matthew, M. L. Costa, D. Metcalfe, "Ultrasound and shockwave therapy for acute fractures in adults," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, issue 6, art. no. CD008579, 2014.
- [8] S. Ebrahim, B. Mollon, S. Bance, J. W. Busse, M. Bhandari, "Low-intensity pulsed ultrasonography versus electrical stimulation for fracture healing: a systematic review and network meta-analysis," *Can. J. Surg.*, vol. 57, no. 3, 2014.
- [9] D. W. Sommerfeldt, C. T. Rubin, "Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton," *Eur. Spine J.*, vol. 10, S86-S95, 2001.
- [10] C. T. Rubin, D. W. Sommerfeldt, S. Judex, Y. X. Qin, "Inhibition of osteopenia by low magnitude, high-frequency mechanical stimuli," *Drug Discov. Today*, vol. 6, no. 16, pp. 848-858, 2001.
- [11] W. R. Thompson, C. T. Rubin, J. Rubin, "Mechanical regulation of signaling pathways in bone," *Gene*, vol. 503, no. 2, 179-193, 2012.
- [12] L. Claes, B. Willie, "The enhancement of bone regeneration by ultrasound," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 93, pp. 384-398, 2007.
- [13] AIUM, "Mechanical bioeffects from diagnostic ultrasound: AIUM consensus statements," Section 2. *J. Ultrasound Med. Biol.* vol. 19, pp. 77-84, 2000.
- [14] W. D. O'Brien, Jr, "Ultrasound-biophysics mechanisms," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 93, pp. 212-55, 2007.
- [15] S. J. Wang, D. G. Lewallen, M. E. Bolander, E. Y. Chao, D. M. Ilstrup, J. F. Greenleaf, "Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model," *J. Orthop. Res.* vol. 12, pp. 40-47, 1994.
- [16] M. J. Perry, L. K. Parry, V. J. Burton, S. Gheduzzi, J. N. Beresford, V. F. Humphrey, T. M. Skerry, "Ultrasound mimics the effect of mechanical loading on bone formation *in vivo* on rat ulnae," *Med. Eng. Phys.* vol. 31, no. 1, pp. 42-47, 2009.
- [17] L. R. Duarte, "The stimulation of bone growth by ultrasound," *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, vol. 101, 153-159, 1983.
- [18] M. A. Dinno, M. Dyson, S. R. Young, A. J. Mortimer, J. Hart, L. A. Crum, "The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound," *Phys. Med. Biol.* vol. 34, pp. 1543-1552, 1989.
- [19] D. F. Webster, W. Harvey, M. Dayson, J. B. Pond, "The role of ultrasound-induced cavitation in the *in vitro* stimulation of collagen synthesis in human fibroblasts," *Ultrasonics*, vol. 8, no. 1, pp. 33-37, 1980.
- [20] J. Parvizi, V. Parpura, J. F. Greenleaf, M. Bolander, "Calcium signaling is required for ultrasound-stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes," *J. Orthop. Res.* vol. 20, no. 1, pp. 51-57, 2002.
- [21] J. Parvizi, C. C. Wu, D. G. Lewallen, J. F. Greenleaf, M. E. Bolander, "Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression" *J. Orthop. Res.*, vol. 17, 488-494, 1999.
- [22] K. H. Yang, J. Parvizi, S. J. Wang, D. G. Lewallen, R. R. Kinnick, J. F. Greenleaf, M. E. Bolander, "Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model," *J. Orthop. Res.*, vol. 14, no. 5, pp. 802-809, 1996.
- [23] M. Ito, Y. Azuma, T. Ohta, K. Komoriya, "Effects of ultrasound and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on growth factor secretion in co-cultures of osteoblasts and endothelial cells," *Ultrasound Med. Biol.* vol. 26, 161-166, 2000.
- [24] K. Naruse, Y. Mikuni-Takagaki, Y. Azuma, M. Ito, T. Oota, K. Kameyama, M. Itoman, "Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clonal ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 286, no. 1, pp. 216-220, 2000.
- [25] T. Kokubu, N. Matsui, H. Fujioka, M. Tsunoda, K. Mizuno, "Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 256, no. 2, pp. 284-287, 1999.
- [26] C. L. Tsai, W. H. Chang, T. K. Liu, G. M. Song, "Ultrasonic effect on fracture repair and prostaglandin E2 production," *Chin. J. Physiol.*, vol. 35, no. 1, pp. 27-34, 1992.
- [27] S. R. Young, M. Dayson, "The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis," *Ultrasound Med. Biol.* vol. 16, no. 3, pp. 261-269, 1990.
- [28] N. M. Rawool, B. B. Goldberg, F. Forsberg, A. A. Winder, E. Hume, "Power Doppler assessment of vascular changes during fracture treatment with low-intensity ultrasound" *J. Ultrasound Med.*, vol. 22, pp. 145-153, 2003.
- [29] K. S. Leung, W. H. Cheung, C. Zhang, K. M. Lee, H. K. Lo, "Low intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic activity of human periosteal cells," *Clin. Orthop.*, vol. 418, 253-259, 2004.
- [30] J. R. Mauney, S. Sjostrom, J. Blumberg, R. Horan, J. P. O'Leary, G. Vunjak-Novakovic, V. Volloch, D. L. Kaplan, "Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds *in vitro*," *Calcif. Tissue Int.* vol. 74, no. 5, pp. 458-468, 2004.
- [31] H. Lu, L. Qin, W. Cheung, K. Lee, W. Wong, K. Leung, "Low-intensity pulsed ultrasound accelerated bone-tendon junction healing through regulation of vascular endothelial growth factor expression and cartilage formation," *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 34, pp. 1248-1260, 2008.
- [32] J. Schortinghuis, B. Stegenga, G. M. Raghoobar, L. G. M. de Bont, "Ultrasound stimulation of maxillofacial bone healing," *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, vol. 14, no. 1, pp. 63-74, 2003.
- [33] O. Rodríguez, "Does low-intensity pulsed ultrasound stimulation effectively promote bone fracture repair? An overview". *World Congress of Medical Physics & Biomedical Engineering*, June 7-12, Toronto, Canada, 2015. Oral presentation.
- [34] S. R. Angle, K. Sena, D. R. Sumner, W. W. Virkus, S. A. Viridi, "Combined Use of Low Intensity Pulsed Ultrasound and rhBMP-2 to Enhance Bone Formation in a Rat Model of Critical-Size Defect. *Journal of Orthopaedic Trauma*," vol. 28, no 10, pp. 605-611, 2014.
- [35] B. H. Min, B. H. Choi, S. R. Park, "Low intensity ultrasound as a supporter of cartilage regeneration and its engineering," *Biotechnol. and Bioprocess Engi.*, vol. 12, pp. 22-31, 2007.