

# Laserterapia e microcorrente na cicatrização de queimadura em ratos. Terapias associadas ou isoladas?

*Low-level laser therapy and micro current in burn wound healing in rats. Associated or isolated therapy?*

*Laserterapia y microcorriente en la cicatrización de quemaduras en ratas. ¿Terapias asociadas o aisladas?*

Rodrigo Pegado de Abreu Freitas<sup>1</sup>, Ana Paula Medeiros de Barcelos<sup>2</sup>, Brenda Medeiros da Nóbrega<sup>2</sup>, Aline Barbosa Macedo<sup>3</sup>, Anderson Rodrigues de Oliveira<sup>4</sup>, Ana Maria de Oliveira Ramos<sup>5</sup>, Wouber Héricson de Brito Vieira<sup>6</sup>

**RESUMO** | Este estudo teve o objetivo de investigar se há diferenças entre as terapias associadas e isoladas do *laser* e microcorrentes no reparo de lesão por queimadura em ratos. Um total de 40 animais foi dividido aleatoriamente em quatro grupos: grupo controle (GC); grupo microcorrente (GM), grupo *laser* (GL) e grupo *laser*/microcorrente (GLM), tratados com *laser* associado a microcorrentes. Após lesões térmicas induzidas no dorso do animal, foi realizado um total de dez dias de tratamento. Amostras do tecido foram coletadas para estudo histopatológico semiquantitativo com Hematoxilina Eosina e Tricrômico de Masson. Foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn. Houve diferença significativa entre os grupos para a produção de fibroblastos ( $p=0,0003$ ), colágeno ( $p=0,0153$ ), neoangiogênese ( $p=0,0031$ ) e anexos cutâneos ( $p=0,0004$ ). Na análise histológica semiquantitativa, o GLM apresentou valores menores nos parâmetros histológicos de presença de colágeno, número de fibroblastos e anexos cutâneos ( $p<0,05$ ) em relação às terapias isoladas, exceto para a neoangiogênese, cujos valores da terapia associada foram semelhantes aos grupos de terapia com modalidade única. Apesar do *laser* e da microcorrente separadamente terem efeitos benéficos para a cicatrização tecidual, a associação das modalidades parece ter diminuído a ação de reparo. No entanto, sugere-se que a associação destes

recursos parece diminuir os efeitos do tratamento quando se comparam os grupos de modalidade única.

**Descritores** | terapia combinada; lasers; estimulação elétrica; cicatrização.

**ABSTRACT** | This study aimed to investigate if there are differences between the associated and isolated therapies from the laser and micro current on healing of burn wound healing in rats. A total of 40 male rats were randomly allocated into four groups: control group (CG), micro current group (MG), laser group (LG) and laser/micro current group (LMG), treated with associated laser and micro current. Thermal damage was done on the back of the animal and a total of ten days therapy was performed. After treatment samples were taken from the lesions to perform semi quantitative histopathological study using Hematoxylin Eosin and Masson Trichrome. The Kruskal-Wallis and Dunn's Test were used for statistical analyses. We observed a significant difference between groups for production of fibroblasts ( $p=0.0003$ ), collagen ( $p=0.0153$ ), neoangiogenesis ( $p=0.0031$ ) and skin annexes ( $p=0.0004$ ). In semi-quantitative histological analysis, the LMG showed lower values in presence of collagen, fibroblasts and number of skin appendages, only for neoangiogenesis, the associated therapy showed similar values to single modality therapy groups. Laser and microcurrent have beneficial

Estudo desenvolvido no Curso de Fisioterapia da Universidade Potiguar (UNP) - Natal (RN), Brasil.

<sup>1</sup>Fisioterapeuta; Professor Mestre do Curso de Fisioterapia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) - Santa Cruz (RN), Brasil.

<sup>2</sup>Fisioterapeuta pela UNP - Natal (RN), Brasil.

<sup>3</sup>Mestre em Fisioterapia pela Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP) - Piracicaba (SP), Brasil.

<sup>4</sup>Fisioterapeuta; Professor Especialista da Universidade Estácio de Sá - Natal (RN), Brasil.

<sup>5</sup>Médica; Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFRN - Natal (RN), Brasil.

<sup>6</sup>Fisioterapeuta; Professor Doutor do Curso de Fisioterapia da UFRN - Natal (RN), Brasil.

Endereço para correspondência: Rodrigo Pegado de Abreu Freitas - Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Rua Trairi, s/n - Centro - CEP: 59200-000 - Santa Cruz (RN), Brasil - E-mail: rodrigopegado@gmail.com  
Apresentação: jun. 2012 - Aceito para publicação: fev. 2013 - Fonte de financiamento: nenhuma - Conflito de interesse: nada a declarar - Parecer de aprovação no Comitê de Ética nº 062/2008.

effects on tissue healing. However, it is suggested that the association of these two therapies reduces the effectiveness of the treatment when compared to single mode treatment.

**Keywords** | combined modality therapy; lasers; electric stimulation; wound healing.

**RESUMEN** | Este estudio tiene el objetivo de investigar si hay diferencias entre las terapias asociadas y aisladas del *láser* y microcorrientes en la reparación de lesión por quemadura en ratas. Un total de 40 animales fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos: grupo control (GC), grupo microcorriente (GM), grupo *láser* (GL) y grupo *láser*/microcorriente (GLM), tratados con *láser* asociado a microcorrientes. Después de inducidas las lesiones térmicas en el dorso del animal, fueron realizados en total diez días de tratamiento. Las muestras de tejido fueron recolectadas para el estudio histopatológico semicuantitativo usando Hematoxilina Eosina y Tricómico de Masson. Fueron utilizados los tests de Kruskal-Wallis y *post-hoc* de Dunn's. Hubo

diferencia significativa entre los grupos para la producción de fibroblastos ( $p=0,0003$ ), colágeno ( $p=0,0153$ ), neoangiogénesis ( $p=0,0031$ ) y anexos cutáneos ( $p=0,0004$ ). En el análisis histológico semicuantitativo, el GLM presentó valores menores en los parámetros histológicos de presencia de colágeno, número de fibroblastos y anexos cutáneos ( $p<0,05$ ) en relación a las terapias aisladas, excepto para la neoangiogénesis, cuyos valores de la terapia asociada fueron semejantes a los grupos de terapia con modalidad única. A pesar de que el *láser* y la microcorriente de forma aislada tienen efectos benéficos para la cicatrización del tejido, la asociación de las modalidades parece haber disminuido la acción de la reparación. El *láser* y las microcorrientes son efectivos en acelerar el proceso de reparación del tejido. Sin embargo, se sugiere que la asociación de estos recursos parece disminuir los efectos del tratamiento cuando son comparados con los grupos de modalidad única.

**Palabras clave** | terapia combinada; Terapia *laser* de baja intensidad; *lasers*; estimulación eléctrica; cicatrización de heridas.

## INTRODUÇÃO

Na fisioterapia, diversos recursos estão sendo empregados para acelerar e melhorar a qualidade do processo regenerativo, como o *laser*, microcorrente, ultrassom e irradiação ultravioleta<sup>1-3</sup>. Estes recursos aceleram o processo de reparo, atuando na sequência de eventos fisiológicos e bioquímicos decorrentes desse processo, como a inflamação, síntese de colágeno, formação do tecido de granulação e reepitelização<sup>1,2</sup>.

A partir da análise de estruturas celulares que são ativadas e/ou inibidas por estes recursos, estudos<sup>2,4,5</sup> realizados em animais de laboratório têm contribuído na elucidação de quais recursos da fisioterapia podem promover um processo regenerativo de qualidade. Os efeitos terapêuticos vêm sendo atribuídos à interação do estímulo energético externo com o tecido biológico (bioestimulação), promovendo aumento da atividade celular durante o processo de reparo<sup>5,6</sup>.

Dentre as modalidades utilizadas, tem destaque a terapia *laser* de baixa intensidade<sup>6-8</sup>, diminuindo o tempo de remodelação e melhorando a qualidade do tecido em neoformação<sup>1,6</sup>. O mecanismo biológico básico promovido por este recurso eletrofísico parece ser a absorção de luz vermelha e infravermelha por cromóforos contidos nos componentes proteicos da cadeia respiratória localizado nas mitocôndrias, que, por sua vez, ao absorverem a energia desencadeiam uma cascata de eventos bioquímicos, resultando no aumento da

atividade enzimática, produção de adenosina trifosfato (ATP), síntese proteica, proliferação celular, deposição e organização do colágeno<sup>9,10</sup>.

Outros autores<sup>11,12</sup> sugerem que a estimulação elétrica por microcorrentes também acelera a síntese de ATP, possui efeito antioxidante, estimula o transporte transmembrana e restabelece a bioeletricidade tecidual, promovendo redução do processo inflamatório, alívio da dor e aceleração do reparo. Neste aspecto, a modalidade teria o objetivo de normalizar o fluxo de correntes, que pode ser interrompido quando ocorre lesão tecidual por queimadura<sup>13,14</sup>.

Assim, o *laser* e a microcorrente têm efeitos positivos em acelerar o processo de reparo quando utilizados isoladamente. Na prática clínica do fisioterapeuta, tem sido observado o uso associado das terapias como forma de potencializar os efeitos supracitados. Entretanto, poucos estudos descrevem esse efeito associado, e, dessa forma, os reais resultados ainda são discutidos. Estudos<sup>7,15</sup> descrevem que, quando utilizada a multiterapia em processos de reparo, os efeitos benéficos podem neutralizar um ao outro. Dentre os diversos modelos experimentais, o nosso estudo utilizou um de lesão térmica em ratos, por poder aplicar as terapias de modo fácil e avaliar todos os parâmetros histológicos necessários para a comparação dos tratamentos.

Portanto, o objetivo do estudo foi investigar se há diferenças entre as terapias associadas e isoladas do *laser* e microcorrentes no reparo tecidual em um modelo de lesão por queimadura em ratos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso entre 250 e 300 g, escolhidos de forma aleatória simples, provenientes do biotério da UNP. Foi realizada alocação aleatória em 4 grupos (n=10): grupo microcorrente (GM), grupo *laser* (GL), grupo controle (GC) e grupo *laser*/microcorrente (GLM). Todos foram submetidos ao mesmo ambiente e ciclo biológico dia/noite com 10 a 12 horas de luz, temperatura e iluminação controladas, umidade mantida por ar-condicionado e mínimo barulho. Os animais permaneceram em gaiolas individuais de polipropileno forradas com serragem e receberam ração Labina® e água. As terapias foram realizadas pelo turno vespertino (14h às 17h). Para os 4 grupos os procedimentos foram aplicados na seguinte sequência: (a) administração de anestésico dissociativo Zoletil® com doses de 50 mg/kg, por via intramuscular no músculo quadríceps; (b) tricotomia no dorso do animal; (c) indução da queimadura de 2° grau<sup>2</sup> com chapa de alumínio de 6 cm X 3 cm pressionada no dorso do animal a 4 cm da base do crânio durante 10 segundos, sendo a chapa aquecida previamente em becker com água a 100°C por um período de 10 minutos, conforme utilizado por Meyerholz et al.<sup>2</sup> e Meireles et al.<sup>16</sup> (Figura 1). Os tratamentos propostos foram iniciados imediatamente após a lesão e aplicados diariamente durante 10 dias. O GC recebeu o mesmo protocolo experimental, com exceção da exposição ao tratamento.

Para a aplicação do *laser*, foi utilizado o aparelho Photon Laser III da marca DMC® São Carlos, SP, com as seguintes características: *laser* visível (AlGaInP) na faixa de 660 nm, modo contínuo, potência de 30 mW, dose de 10 J/cm<sup>2</sup> e energia de 0,3 J por ponto de aplicação, durante 9 segundos por ponto no interior da queimadura. Na região adjacente à ferida (bordas) foi utilizada a mesma potência, porém com dose de 12 J/cm<sup>2</sup> e energia de 0,33 J por ponto durante 11 segundos. A aplicação foi realizada por meio da técnica pontual em contato direto com a ferida, onde a probe era posicionada com leve pressão em angulação de 90°. Foi respeitado o intervalo de 1,5 cm entre os pontos, totalizando 6 pontos no leito da queimadura e 14 pontos na região adjacente à mesma, totalizando 20 pontos por animal. Para a microcorrente foi usado o aparelho Physiotonus Microcurrent Stimulator da marca Bioset®, aplicando-se uma corrente pulsada monofásica, quadrada e de polaridade reversível a cada 2,5 s, intensidade de 160 µA e frequência de 60 Hz,

durante 15 minutos, por meio de dois eletrodos adesivos de silicone (Valutrode®) com 3,2 cm<sup>2</sup> de diâmetro dispostos nas extremidades da ferida.

Para o GLM foi aplicada primeiramente a terapia *laser* e, em seguida, a por microcorrente. Os dois equipamentos foram previamente calibrados e garantidos por seus fornecedores.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Potiguar (UNP) sob parecer nº 062/2008.

## Histologia

Após 24 horas da última terapia, os animais foram sacrificados por meio de uma câmara fechada com liberação de CO<sub>2</sub>. No instante após o sacrifício, foi realizada a biópsia do tecido da pele a 7 cm da base do crânio para estudo histológico, incluindo a ferida em cicatrização, a borda da ferida e parte da pele adjacente à borda da ferida. As amostras foram fixadas em formalina, incluídas em blocos de parafina, levadas ao micrótomo e cortadas em seções de 5 µm de espessura. As seções sagitais foram mantidas em estufa para secagem, e os cortes, posteriormente submetidos à coloração por hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson. A análise do tecido foi realizada por um avaliador cego utilizando microscópio óptico Nikon® (Nikon, Tokyo, Japão). Todos os critérios aplicados na análise histológica semiquantitativa<sup>16,17</sup> foram verificados por meio de escores em uma escala de 0 a 3 (Tabela 1).

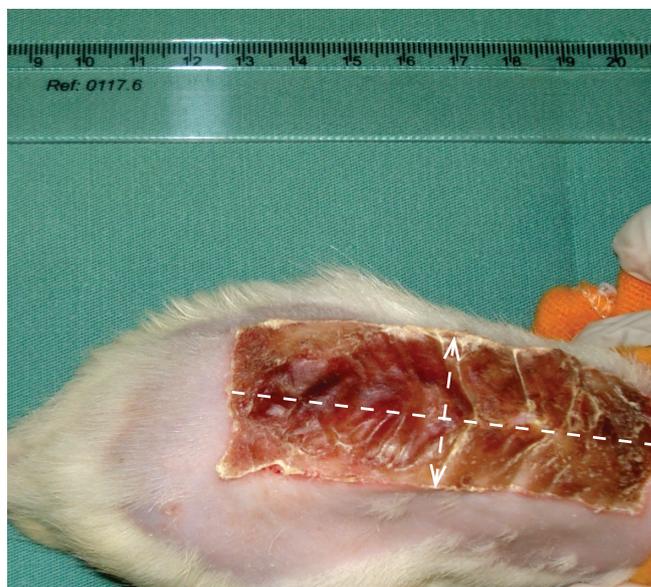


Figura 1. Modelo de queimadura utilizado. Adaptado de Meireles et al.<sup>16</sup>. Ferida em remodelação com perda do revestimento epidérmico e nenhum sinal de infecção. A biópsia da pele do animal foi retirada a partir do ponto médio entre as linhas pontilhadas (em branco) da figura

Tabela 1. Critérios para análise histológica

Histologia	Score			
	Nulo=0	Leve=1	Moderado=2	Intenso=3
Reepitelização	Ausente	Presente: abrangendo <50% da ferida	Presente: abrangendo >50% da ferida	Presente: cobrindo 100% com espessura regular
Inflamação aguda	Ausente	<25% de neutrófilos	<25-50% de neutrófilos	>50% de neutrófilos
Número de fibroblastos	Ausente	<25% fibroblastos jovens e menos diferenciados entre os outros tipos de células	<25-50% fibroblastos jovens e menos diferenciados entre os outros tipos de células	>50% fibroblastos jovens e menos diferenciados entre os outros tipos de células
Neoangiogênese	Ausente	Menos que o observado no tecido sadio adjacente	Montante semelhante ao observado no tecido sadio adjacente	Mais que o observado no tecido sadio adjacente
Anexos cutâneos	Ausente	<25% em relação ao observado no tecido sadio adjacente	>25-50% em relação ao observado no tecido sadio adjacente	>50% em relação ao observado no tecido sadio adjacente
Número de fibras colágenas	Ausente	Coloração vermelha menos intensa que a observada no tecido saudável adjacente	Coloração vermelha semelhante à observada no tecido saudável adjacente	Coloração vermelha mais intensa que a observada no tecido saudável adjacente

Adaptado de Meireles et al.<sup>16</sup> e Iordanou et al.<sup>17</sup>

## Análise estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o software IBM SPSS® 19 e o GraphPad Prism® 5. Na comparação das médias não paramétricas intergrupo usou-se o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. Foi considerado  $p < 0,05$  como significativo.

## RESULTADOS

No décimo dia após a queimadura, o aspecto da lesão cutânea no GL, GM e GLM evidenciava perda do revestimento epidérmico e da hipoderme, representando uma queimadura de segundo grau<sup>2</sup>, com reação inflamatória aguda moderada, porém com ferida limpa e sem infecção. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à regeneração epitelial ( $p=0,0568$ ) e processo inflamatório ( $p=0,9640$ ). Observamos diferença significativa entre os grupos no número de fibroblastos ( $p=0,0003$ ), colágeno ( $p=0,0153$ ), neoangiogênese ( $p=0,0031$ ) e anexos cutâneos ( $p=0,0004$ ).

Para o aumento da presença de fibroblastos, a aplicação de apenas uma das modalidades foi mais eficaz que a terapia associada (Figura 2A). O GM não demonstrou diferença quando comparado com o GLM em relação à presença de fibras de colágeno (Figura 2B). Houve aumento significativo para neoangiogênese em todos os grupos tratados quando comparado ao GC (Figura 2C), porém, a terapia associada (GLM) não apresentou diferença significativa quando comparada com as terapias aplicadas isoladamente (GL e GM). O GM registrou melhora significativa quando

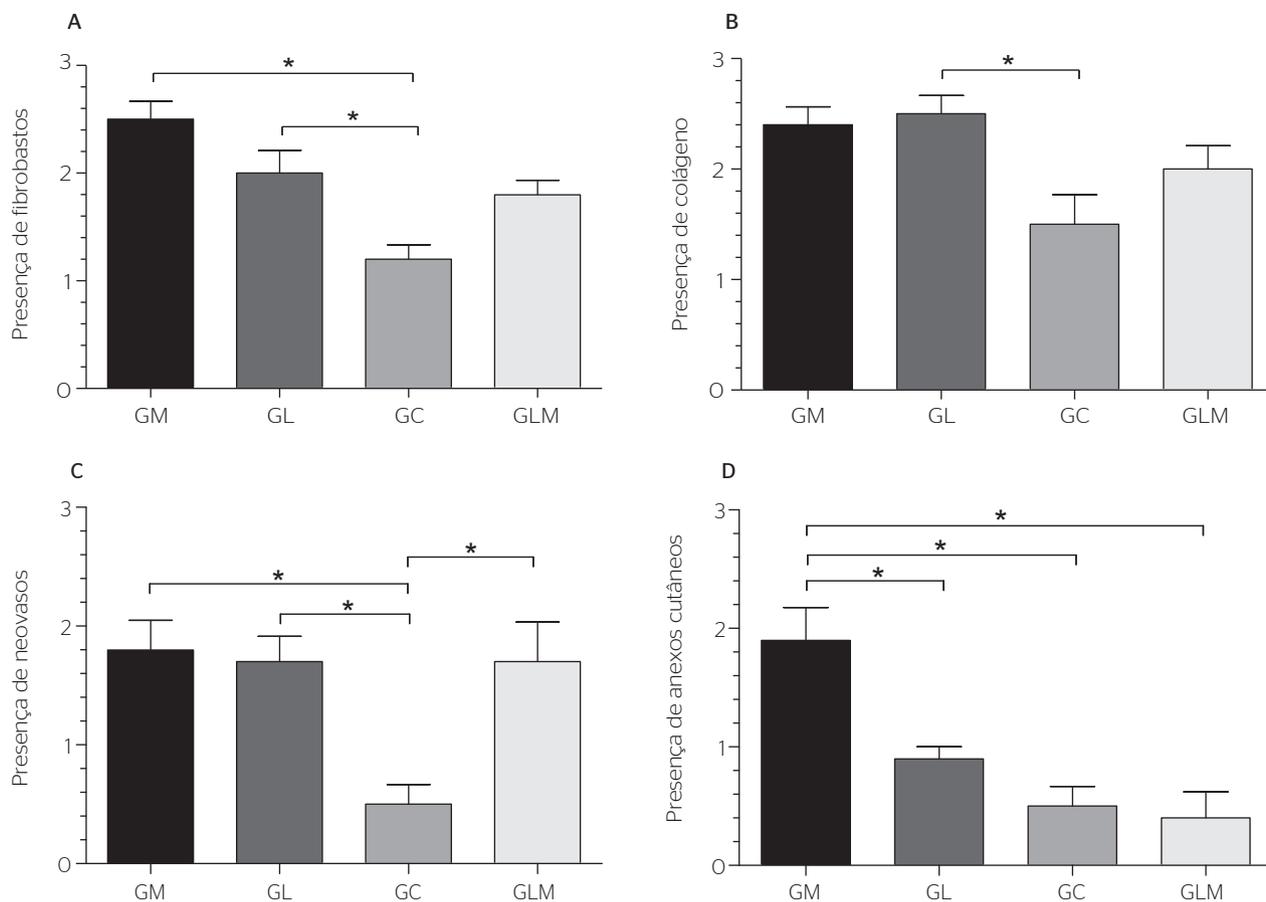
comparado aos outros grupos em relação à presença de anexos cutâneos (Figura 2D). Apenas para neoangiogênese, a terapia associada teve valores semelhantes aos grupos de terapia com modalidade única.

## DISCUSSÃO

Utilizando um modelo de queimadura em ratos Wistar, foi observado que quando aplicado em associação, o *laser* visível de AlGaInP (660 nm e potência de 30 mW) e a microcorrente (160  $\mu$ A e frequência de 60 Hz) promoveram melhora significativa apenas na formação de novos vasos sanguíneos quando comparado à terapia com modalidade única. Em todos os outros parâmetros avaliados, o uso individual de uma das terapias isoladas foi melhor (fibroblasto, colágeno e anexos cutâneos) que a terapia conjunta.

Evidências sugerem que o uso do comprimento de onda vermelho ou infravermelho em uma série de parâmetros de dosagem (mediana de 4,2 J/cm<sup>2</sup>), incluindo as utilizadas no presente estudo, resultam em benefícios significativos na cicatrização de feridas em modelos animais e processos patológicos em humanos<sup>18,19</sup>. A utilização *laser* em diferentes comprimentos de onda é capaz de acelerar a formação da epiderme, aumentar a espessura da camada epitelial e promover neovascularização e reorganização de fibras colágenas<sup>1,2,20-25</sup>. O resultado do tratamento varia de acordo com parâmetros, sendo o *laser* visível mais utilizado por ser mais superficial e interagir especificamente com cromóforos superficiais, se adequando ao tratamento de lesões epiteliais<sup>18,19,23</sup>.

A microcorrente também se apresenta como um recurso eficaz no processo de reparo<sup>13,15</sup>. Agne et al.<sup>24</sup>,



\*Significativo com  $p < 0.05$ ; GM: Grupo microcorrente; GL: Grupo laser; GC: Grupo controle; GLM: Grupo laser/microcorrente  
 Figura 2. Comparação intergrupo das variáveis histológicas por meio do pós-teste de Dunn

estudando o processo de cicatrização em porcos da índia com o uso de corrente elétrica de 50  $\mu\text{A}$ , descreveram aumento na migração de fibroblastos e células inflamatórias e maior alinhamento das fibras de colágeno, contribuindo para o reparo. Já Santos et al.<sup>5</sup>, usando microcorrente de 50  $\mu\text{A}$  para o tratamento de queimadura em ratos, observaram número de fibroblastos e colágeno superior ao grupo controle. Demir, Balay e Kirnap<sup>15</sup>, com microcorrentes de 300  $\mu\text{A}$  por 30 min/dia, observaram melhora na proliferação e maturação celular, estimulando a fibroplasia. Esses achados positivos quanto ao número de fibroblastos e aumento das fibras de colágeno também foram verificados em nossa pesquisa. Estudos *in vitro* sugerem que a microcorrente de 100  $\mu\text{A}$  e o laser promovem a migração<sup>26</sup> e a proliferação<sup>23</sup> de fibroblastos dérmicos humanos.

O laser e a microcorrente representam um excelente alvo terapêutico para promover neoangênese durante o processo de cicatrização. As células endoteliais dos microvasos parecem ser sensíveis à estimulação laser por meio da expressão de proteínas gênicas regulatórias do

ciclo celular e da proliferação dessas células<sup>27</sup>. Bai et al.<sup>28</sup> descrevem que campos elétricos de 150 a 400 mV/mm também realizam a migração, reorientação e alongamento de células endoteliais de vasos da microcirculação.

As células endoteliais da microcirculação apresentam comportamentos diferentes quando comparadas com tecidos macrovasculares, sugerindo que cada tipo celular possui uma disposição distinta de receptores e tolerância a campos elétricos diferentes, contribuindo para a ativação ou não do fator de crescimento endotelial vascular<sup>28</sup>.

Mesmo com o laser e a microcorrente atuando positivamente no reparo em vários tipos de modelo, como retalho cutâneo<sup>1</sup>, úlceras diabéticas<sup>6</sup> e queimaduras por temperatura<sup>5,16,24</sup>, seu uso associado ainda merece mais discussão.

Gum et al.<sup>7</sup> reportam a ideia de que a terapia combinada pode ocasionar overdose de estímulos para a célula, levando a uma anulação dos efeitos terapêuticos. Seu estudo utilizando laser e microcorrente observou melhora na força, elasticidade, tensão e esforço máximo em

tendões de coelhos. As melhorias da multiterapia foram consistentes, mas menos notáveis quando comparadas com protocolos de modalidade única. É possível que a estimulação elétrica possa ter dificultado a ocorrência de reações celulares e moleculares envolvidas no processo de reparo, como a expressão gênica de fatores de crescimento celular, erros no processo de diferenciação celular e alterações no comportamento de receptores e canais iônicos. Por atuarem no metabolismo celular, apontamos hipóteses de fadiga celular, alterações na sinalização celular ou nas vias metabólicas da célula<sup>27,28</sup>.

O *laser* e a microcorrente parecem atuar diretamente na expressão de fatores de crescimento celular em vários tipos de célula (fibroblasto, endotélio vascular, células epiteliais) relacionados ao processo de reparo. No entanto, cada tipo parece possuir certo limiar (dose necessária para efeitos positivos) e tolerância (dose máxima para produzir efeitos positivos) a estímulos energéticos.

Apesar do *laser* e da microcorrente separadamente serem benéficos para a cicatrização de tecidos, sua combinação parece diminuir a ação terapêutica. Os resultados recomendam atenção durante o tratamento de lesões dérmicas por queimadura, e a sugestão da terapêutica com essas modalidades de modo independente pode ser o melhor curso de ação. Os mecanismos de ação celular e biofísico que envolve o uso combinado de recursos terapêuticos merecem maior investigação para obter uma explicação mais completa dos fenômenos analisados.

## CONCLUSÃO

O estudo concluiu que, aplicados separadamente, o *laser* e a microcorrente aceleram o processo de reparo em queimaduras. No entanto, quando associados promovem melhora somente na neovascularização, não apresentando melhora significativa na regeneração epitelial, processo inflamatório, colágeno, fibroblastos e anexos cutâneos. Sugere-se que a associação dos dois recursos diminui os efeitos do tratamento quando comparada aos grupos de modalidade única.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à UNP pelo espaço cedido e à DMC® Importação e Exportação de Equipamentos LTDA, de São Carlos (SP), pela doação do aparelho *laser*.

## REFERÊNCIAS

- Maiya GA, Kumar P, Rao L. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(2):187-90.
- Meyerholz DK, Piester TL, Sokolich JC, Zamba GK, Light TD. Morphological parameters for assessment of burn severity in an acute burn injury rat model. *Int J Exp Pathol.* 2009;90(1):26-33.
- Okuni I. Phototherapy in rehabilitation medicine. *Masui.* 2012; 61(7):700-5.
- Hussein AJ, Alfars AA, Falih MA, Hassan AN. Effects of a low level laser on the acceleration of wound healing in rabbits. *N Am J Med Sci.* 2011;3(4):193-7.
- Santos VNS, Ferreira LM, Horibe EK, Duarte IS. Electric microcurrent in the restoration of the skin undergone a trichloroacetic acid peeling in rats. *Acta Cir Bras.* 2004;19(5):466-70.
- Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen.* 2001;9(3):248-55.
- Gum SL, Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Combined ultrasound, electrical stimulation, and laser promote collagen synthesis with moderate changes in tendon biomechanics. *Am J Phys Med Rehabil.* 1997;76(4):288-96.
- Stadler I, Lanzafame RJ, Evans R, Narayan V, Dailey B, Buehner N, et al. 830-nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. *Lasers Surg Med.* 2001;28(3):220-6.
- Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(4):355-61.
- Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem. Photobiol Sci.* 2004;3(2):211-6.
- Konikoff JJ. Electrical promotion of soft tissue repairs. *Ann Biomed Eng.* 1976;4(1):1-5.
- Lee BY, Al-Waili N, Stubbs D, Wendell K, Butler G, Al-Waili T, et al. Ultra-low microcurrent in the management of diabetes mellitus, hypertension and chronic wounds: report of twelve cases and discussion of mechanism of action. *Int J Med Sci.* 2009;7(1):29-35.
- Lee BY, Wendell K, Al-Waili N, Butler G. Ultra-low microcurrent therapy: a novel approach for treatment of chronic resistant wounds. *Adv Ther.* 2007;24(6):1202-9.
- Cheng N, Van Hoff H, Bockx E, Hoogmartens MJ, Mulier JC, De Dijcker FJ, et al. The effects of electric currents on ATP generation, protein synthesis, and membrane transport in rat skin. *Clin Orthop Relat Res.* 1982;171:264-72.
- Demir H, Balay H, Kirnap M. A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev.* 2004;41(2):147-54.
- Meireles GC, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro AL. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(1):47-54.
- Iordanou P, Lykoudis EG, Athanasiou A, Koniaris E, Papaevangelou M, Fatsea T, et al. Effect of visible and infrared polarized light on the healing process of full-thickness skin wounds: an experimental study. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(2):261-7.
- Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(3):291-325.

19. Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Photodynamic modulation of wound healing: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(3):118-48.
20. Güngörmüş M, Akyol U. The effect of gallium-aluminum-arsenide 808-nm low-level laser therapy on healing of skin incisions made using a diode laser. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(6):895-9.
21. Reddy GK, Gum S, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: part II. Effects of combined laser therapy and electrical stimulation. *Med Sci Sports Exerc.* 1998;30(6):794-800.
22. Zhao M, Bai H, Wang E, Forrester JV, McCaig CD. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 3):397-405.
23. Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Sanford LE, Woodruff LD. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(4):323-9.
24. Agne JE, Lorenzini S, Bechman L, Hamerski Romero C, Casagrande R. Uso de microcorrientes en ratones Wistar con úlceras diabéticas: resultados histológicos. *Fisioterapia.* 2004;26(3):164-9.
25. Kloth LC. Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials. *Int J Low Extrem Wounds.* 2005;4(1):23-44.
26. Sugimoto M, Maeshige N, Honda H, Yoshikawa Y, Uemura M, Yamamoto M, et al. Optimum microcurrent stimulation intensity for galvanotaxis in human fibroblasts. *J Wound Care.* 2012;21(1):5-6, 8,10.
27. Feng J, Zhang Y, Xing D. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway. *Cell Signal.* 2012;24(6):1116-25.
28. Bai H, McCaig CD, Forrester JV, Zhao M. DC electric fields induce distinct preangiogenic responses in microvascular and macrovascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(7):1234-9.