

Efeitos do laser de baixa potência, sob diferentes protocolos, no reparo de feridas cutâneas em ratos

Effects of low-level laser therapy under different protocols on skin wound healing in rats

Sônia Sotto- Maior Fortes Garcia Rodrigues¹

Bruno Salles Sotto- Maior²

Davi Romeiro Aquino³

Ana Lia Anbinder³

Correspondência: ana.anbinder@unitau.br

RESUMO

Apesar dos numerosos trabalhos confirmando o potencial biomodulador do laser, os parâmetros e protocolos ideais para sua aplicação ainda não foram bem estabelecidos. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do laser de baixa potência, sob diferentes protocolos, na reparação de feridas cutâneas em ratos. Depois de realizadas feridas padronizadas de 8 mm de diâmetro no centro do plano sagital médio no dorso de quarenta ratos, os animais foram divididos em quatro grupos: G1, sem exposição ao laser; G2, exposição ao laser imediatamente após a cirurgia; G3, exposição ao laser conforme G2 e 48h após cirurgia; G4, exposição ao laser idem a G3 e sete dias após a cirurgia. As áreas das feridas foram medidas imediatamente após cirurgia, 48h, sete dias e no décimo dia (sacrifício) utilizando-se programa para análise de imagens. Após o sacrifício, removeram-se as áreas correspondentes às feridas e o tecido ao redor e procedeu-se ao preparo de rotina para confecção de lâminas histológicas. Seis cortes de cada animal foram fotografados e realizou-se contagem de fibroblastos. Para a análise estatística, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (5%). Em todos os períodos, G1 apresentou a menor área de reparação, evidenciando os efeitos do laser na redução macroscópica das lesões. Os grupos irradiados apresentaram também proliferação de fibroblastos superior ao controle, sendo que o protocolo de duas aplicações resultou no maior número de fibroblastos aos dez dias. Concluiu-se que o laser favoreceu a cicatrização e que o processo foi acelerado nos grupos que receberam mais de uma aplicação.

PALAVRAS-CHAVE: Cicatrização de feridas. Fibroblastos. Ratos. Terapia a Laser de Baixa Intensidade.

ABSTRACT

Although there are many studies confirming laser biomodulation, appropriate parameters and treatment protocols have not yet been established. The aim of this study was to analyze the effects of a low-level laser therapy under different protocols on skin wound healing in rats. Standardized 8-mm circular wounds were made in the dorsal midline backs of forty rats. The animals were divided into four groups: G1, without laser; G2, laser immediately after surgery; G3, laser immediately after surgery and again after 48 h; G4, laser immediately after surgery, after 48 h and after seven days. The wound areas were measured immediately after surgery, after 48 h, after seven days and after ten days (when the animals were sacrificed) using an image analysis software. After sacrifice, the wounds and surrounding tissues were removed and submitted to routine laboratorial processing and histological slide confection. Six slides of each animal were photographed, and fibroblast counts were made. For statistical evaluation, the Kruskal-Wallis test and a 5% significance level were used. The control group showed less progression of repair than other groups at all observation times, highlighting the effect of lasers in healing in biometrical analysis. Irradiated groups showed increased fibroblast proliferation relative to the control group, and the protocol with two periods of irradiation resulted in higher fibroblast numbers after ten days. It was concluded that the laser treatment aided in wound healing and that the repair process was faster in the groups that received more than one application of the laser.

KEY WORDS: Wound healing. Fibroblasts. Rats. Laser Therapy, Low-Level.

1 Universidade Federal de Juiz de Fora

2 Universidade Estadual de Campinas

3 Universidade de Taubaté

INTRODUÇÃO

A luz laser possui propriedades distintas da luz comum, tais como monocromaticidade, emitindo radiações em um único comprimento de onda; coerência, permitindo que o feixe se propague na mesma direção no tempo e no espaço com a mesma frequência; e colimação, pois devido à alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos, o feixe é unidirecional, praticamente paralelo com divergência mínima [1]. São justamente as características especiais desse tipo de luz que a fazem ter propriedades terapêuticas importantes (laser de baixa potência ou terapêutico) e ser utilizada em cirurgias (laser de alta potência).

O laser de baixa potência vem sendo estudado há cerca de 40 anos e, na Odontologia, tem sido indicado nos casos de aftas, pulpotomia, mucosite, regeneração nervosa e nevralgia pós-herpética [2]. Os efeitos terapêuticos do laser sobre os diferentes tecidos biológicos são demonstrados em estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, destacando-se os trabalhos que relatam aumento na microcirculação local [3-6], redução do número de células inflamatórias [7], efeitos analgésicos [8, 9], estímulo da proliferação de células epiteliais [4, 6] e fibroblastos [6, 10], assim como aumento na síntese de colágeno [6, 11]. Os resultados variam de acordo com o modo de tratamento (com contato ou sem contato da ponta emissora), com a densidade de potência, dose, comprimento de onda, número e frequência de exposição ao laser e duração do tratamento [12]. No entanto, apesar dos numerosos trabalhos confirmando a atuação do laser como instrumento de potencial biomodulador, os parâmetros e protocolos considerados ideais para sua aplicação ainda não foram estabelecidos.

O objetivo, portanto, deste trabalho, foi avaliar clínica, biométrica e histologicamente em ratos o reparo de feridas tratadas com laser de baixa potência, sob diferentes protocolos de administração, exequíveis no consultório odontológico.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados quarenta ratos (*Ratus norvegicus*, *albinus*, Wistar), machos, com peso variando entre 160 e 220 g, mantidos em gaiolas individuais e tratados com ração granulada comercial e água *ad libitum*, antes e durante o período experimental. Esses animais procederam do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Minas Gerais. O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal / UFJF.

Após anestesia com cloridrato de xilasina (Rompum- Bayer S.A. São Paulo, SP, Brasil) e cloridrato de cetamina (Vetanarcol - König S.A. Avellaneda, BA, Argentina), na proporção de 2:1 e 0,1ml da mistura para cada 100g de peso, por via intramuscular, a região dorsal dos ratos foi tricotomizada. Com auxílio de um *punch* de 8 mm de diâmetro removeu-se um fragmento circular de pele, no centro do plano sagital mediano. As feridas incluíram as camadas da epiderme e da derme até a fáscia muscular.

Os animais foram divididos ao acaso em quatro grupos de dez: grupo 1 (G1-controle), não submetido a nenhum tratamento; grupo 2 (G2) com a aplicação do laser nas feridas imediatamente após o ato cirúrgico; grupo 3 (G3), com aplicação do laser conforme G2 e 48h após o ato cirúrgico e grupo 4 (G4), com aplicação do laser conforme G3 e sete dias após o ato cirúrgico. Para as aplicações de laser após 48h e sete dias, os animais foram novamente anestesiados.

O laser utilizado para as aplicações foi um laser de diodo, emissão infravermelha, contínua, de Arsênio e Gálio (AsGa), comprimento de onda de 780 nanômetros e potência de 70mW. A aplicação foi realizada por meio de fibra ótica e a área da ponta emissora era de 4mm². As lesões foram submetidas à aplicação do laser com contato entre a ponta ativa e a ferida em oito localizações diferentes na periferia da lesão e num ponto central em forma de varredura, o que permitiu que toda a ferida recebesse tratamento uniforme. O tempo de exposição por ponto de aplicação foi de 3s, totalizando 27s de exposição por ferida a cada sessão. Foi utilizada a dose de energia por ponto de 3,8J/cm² e potência de 15mW.

Todas as lesões foram avaliadas clinicamente e documentadas por meio de fotografias digitais padronizadas, utilizando câmera fotográfica digital (DSC-W1 Cyber-shot 5.1 Sony-New York, NY, EUA) acoplada em estativa, imediatamente após a realização do procedimento cirúrgico, 48h, sete dias e no décimo dia (sacrifício).

Decorridos dez dias, a contar do ato cirúrgico, os animais foram sacrificados por dose excessiva de anestésico. As peças foram colhidas cuidadosamente, de maneira a incluir parte da pele adjacente às bordas da ferida e de todo o tecido cicatricial na sua profundidade. Todas as peças obtidas foram fixadas em formalina 10% por 24 horas no mínimo. A seguir, os espécimes foram hemisseccionados no sentido crânio-caudal e incluídos em parafina para realização de seis cortes transversais semisseriados com 5µ de espessura, corados com hematoxilina e eosina (HE) e avaliados sob microscopia de luz.

As áreas das feridas nos diferentes tempos, zero hora, 48h, sete dias e dez dias, foram medidas nas imagens digitais utilizando-se o programa ImageJ 1.32J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). As medidas foram realizadas três vezes em momentos distintos e o coeficiente de variação das três medidas repetidas foi utilizado para avaliação da calibração intraexaminador. Utilizando-se a média das três medidas, calculou-se o percentual de redução do tamanho das feridas nos períodos de 48h, sete e dez dias em relação à medida no tempo inicial.

As imagens histológicas foram digitalizadas e determinaram-se campos de contagem na porção central da lesão, à distância de cerca de 600µm da superfície do epitélio, com objetiva de 40x. Cada campo representou uma região digitalizada de 1300 pixels (paralelo ao epitélio) por 1030 pixels (perpendicular ao epitélio). Por meio do programa AxioVision (Zeiss, Berlim, Berlim, Alemanha) foi realizada a contagem de fibroblastos, considerados como células com núcleo elíptico claro, grande e de forma ovoide contendo um ou dois nucléolos.

Todas as medidas foram realizadas por um único examinador que desconhecia o grupo ao qual pertenciam os espécimes. Os dados foram submetidos à estatística descritiva e ao teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5%, com auxílio do programa BioEstat 2.0 (Sociedade Civil Mamirauá, Belém, PA, Brasil).

RESULTADOS

Em decorrência da relativa mobilidade do tecido seccionado, algumas feridas, imediatamente após sua confecção, apresentaram-se maiores em relação ao tamanho proposto, mesmo tomando-se cuidados quanto à padronização.

Clinicamente, não foi encontrada diferença entre os grupos irradiados, independentemente do protocolo utilizado. Após 48 horas, as lesões do grupo controle (G1- Figura 1A) estavam recobertas por crosta fina, muitas vezes com halo eritematoso. Não houve descolamento da crosta em nenhuma lesão deste grupo. As feridas dos grupos irradiados (Figura 1B) apresentaram-se com bordos e centro mais secos que as do grupo controle e muitas vezes sem halo eritematoso. Em alguns animais, foi observado um início de descolamento das crostas. Aos sete dias, observou-se em G1 (Figura 1C) crostas secas, descolamento a partir da porção epitelizada e presença de áreas avermelhadas ao redor dos bordos, ainda em alguns animais. Nos grupos irradiados (Figura 1D), algumas feridas perderam suas crostas e o tecido periférico apresentava-se delgado e seco. No dia do sacrifício, nas feridas do grupo G1 (Figura 1E), verificou-se na área de reparação, parcial, linha esbranquiçada com bordos fracamente elevados, evidenciando cicatrizes. Nos grupos irradiados (Figura 1F), praticamente todas as feridas estavam reparadas por completo, com cicatrizes evidentes. Em nenhum animal foi observada evidência clínica de infecção durante todo o período analisado.

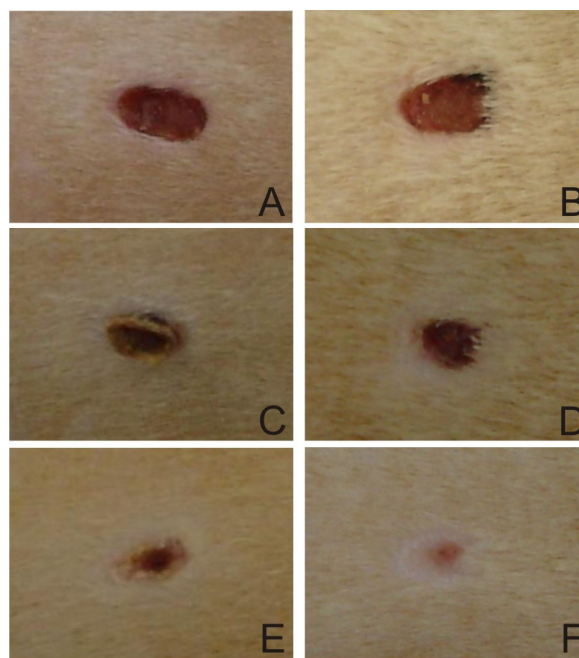


Figura 1 – Aspecto clínico das lesões cutâneas. A) Grupo controle - período de 48 horas. B) Grupo irradiado - período de 48 horas. C) Grupo controle - período de sete dias. D) Grupo irradiado - período de sete dias. E) Grupo controle - período de dez dias. F) Grupo irradiado - período de dez dias

Devido ao óbito de um animal, foram utilizadas nove amostras de cada grupo para a avaliação biométrica da área das feridas. Os coeficientes de variação das três medidas repetidas situaram-se na faixa de 0,07% a 2,83%.

Após análise estatística intragrupo dos valores de porcentagem de redução da área da ferida, verificou-se redução significativa entre todos os períodos experimentais, sendo a área reduzida com o passar do tempo, independentemente do tratamento.

As Figuras 2A, 2B e 2C ilustram a média e o desvio-padrão dos valores de porcentagem de redução de área da ferida e o resultado da estatística inferencial intergrupos nos períodos de 48h, sete e dez dias, respectivamente.

Devido a dificuldades durante o processo de preparação histológica, alguns espécimes não puderam ser analisados e foram utilizadas sete amostras por grupo. Os dados relativos ao número de fibroblastos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e, após a comparação de postos médios, verificou-se ausência de diferença estatística apenas entre os grupos G2 e G4. Os valores de média e desvio-padrão da contagem de fibroblastos e o resultado da comparação entre os grupos podem ser observados na Figura 2D.

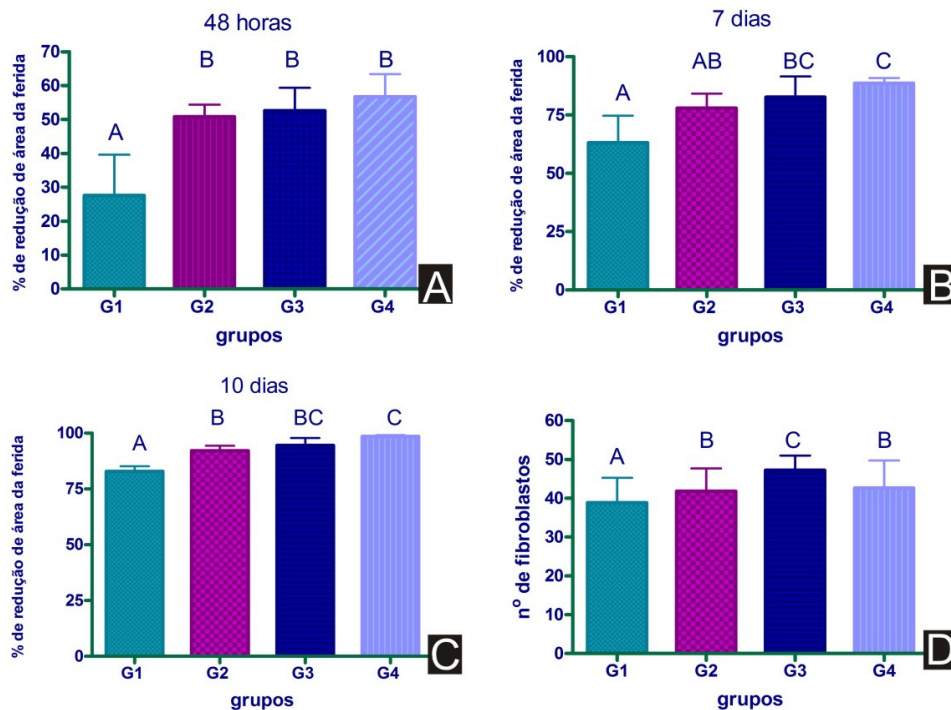


Figura 2- Médias, desvios-padrão e resultado da análise estatística inferencial (Kruskal-Wallis, 5%). Letras iguais significam ausência de diferença estatística. A) Porcentagem de redução de área da ferida. Período de 48h. B) Porcentagem de redução de área da ferida. Período de sete dias. C) Porcentagem de redução de área da ferida. Período de dez dias. D) Número de fibroblastos

Em todos os grupos a região correspondente à ferida apresentava-se recoberta por epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, de menor espessura que o epitélio adjacente. Na derme, desprovida de anexos cutâneos, a região era preenchida por tecido de granulação, composto por fibras colágenas mais delicadas do que as observadas no conjuntivo sadio, fibroblastos jovens, vasos sanguíneos neoformados, macrófagos e infiltrado inflamatório. O grupo G1 apresentava junto à borda da ferida proliferação epitelial visível, além de edema em alguns espécimes, vasos congestionados e áreas de hemorragia. Em regiões mais profundas, notou-se a presença de infiltrado inflamatório misto, com linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos. Nas feridas irradiadas, verificou-se tecido de granulação mais organizado, rico em fibras colágenas e fibroblastos orientados paralelamente à superfície, quando comparadas às do grupo G1. A Figura 3 ilustra alguns dos aspectos histológicos encontrados.

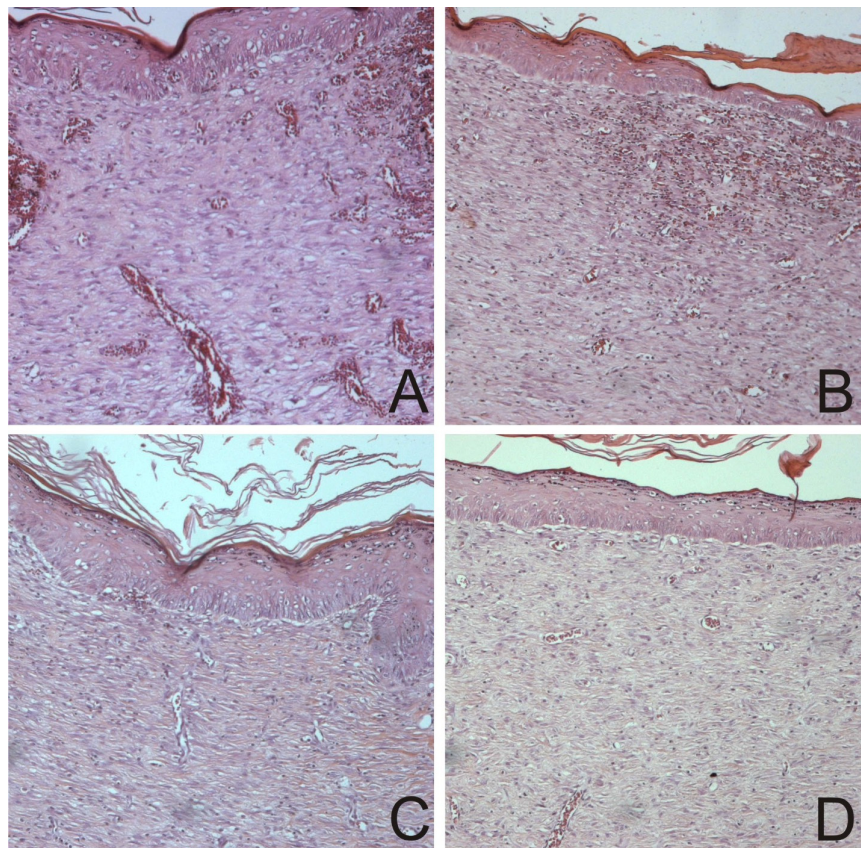


Figura 3- Aspecto microscópico da região da ferida. Aumento original de 100x. Coloração de hematoxilina e eosina. A) G1. Tecido de granulação com numerosos vasos sanguíneos congestionados, infiltrado inflamatório crônico em situação perivascular e área de hemorragia. B) G2. Tecido de granulação apresentando menos vasos sanguíneos congestionados e infiltrados inflamatórios especialmente na região abaixo do epitélio delgado. C, D) G3 e G4. Tecido de granulação de aspecto mais maduro que o encontrado em G1.

DISCUSSÃO

O estudo da atuação do laser de baixa potência na reparação de tecidos tem sido objeto de muitas pesquisas, especialmente no que concerne a um protocolo de irradiação ideal, que ainda não foi estabelecido. O protocolo utilizado neste trabalho, com irradiações após a cirurgia, 48h e sete dias é facilmente exequível na clínica, podendo ser realizado nas consultas pós-operatórias do paciente. Foram utilizadas neste trabalho doses de $3,8 \text{ J/cm}^2$ e potência de 15mW [13]. Walsh [2] revisou vários estudos sobre os efeitos do laser de baixa potência nos fibroblastos, confirmando sua ação dose-dependente na proliferação das células em cultura. Enquanto doses baixas (2J/cm^2) são estimulantes, doses maiores (16J/cm^2) podem apresentar o efeito inverso. Doses muito baixas não demonstraram ação efetiva da irradiação do laser de baixa potência (14). Demir et al. [15] observaram um maior número de fibroblastos no décimo dia de seus experimentos utilizando doses de 1J/cm^2 por dez dias consecutivos. Já Garcia et al. [16] relataram um aumento de fibroblastos nos grupos irradiados no sétimo dia pós-cirúrgico utilizando dose de 3J/cm^2 , semelhante à dose empregada nesta pesquisa.

A frequência e o número de irradiações também têm sido bastante estudados [17-21], e apenas uma irradiação não tem se mostrado suficiente para alcançar efeito celular em alguns trabalhos [22, 23], que discordam dos nossos resultados. O protocolo de aplicação única de laser foi superior ao controle na análise biométrica aos dez dias e com relação ao número de fibroblastos. No trabalho de Pourreau-Schneider et al. [19], o efeito de bioestimulação do laser no crescimento de fibroblastos em cultura após uma única irradiação foi considerado satisfatório quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento, porém quando foram feitas duas (ou três) aplicações houve uma maior proliferação, resultados concordantes com nossas avaliações.

Após 48h, conforme esperado, não houve diferença significativa na evolução da cicatrização das lesões entre os grupos G2, G3 e G4, uma vez que todos receberam aplicação do laser imediatamente após a cirurgia. Em todos os períodos, o grupo G1 apresentou a menor área de reparação quando comparado aos demais, evidenciando os efeitos do laser na redução macroscópica das lesões. Aos dez dias, o protocolo de uma aplicação de laser 48h depois da cirurgia associada à aplicação no ato cirúrgico (G3) não se refletiu em diferença estatisticamente significativa na redução da área, quando comparado ao protocolo de aplicação única (G2).

Apesar de o protocolo de três aplicações (G4) ter sido superior ao de aplicação única (G2), não diferiu significativamente do de duas aplicações (G3).

Em nosso trabalho, todos os grupos irradiados apresentaram proliferação de fibroblastos superior ao grupo controle, sendo que o protocolo de duas aplicações resultou no maior número de fibroblastos aos dez dias. Dado que na análise biométrica aos dez dias não houve diferença entre os protocolos de duas ou três aplicações, com relação aos parâmetros analisados, o protocolo de duas aplicações de laser foi o mais efetivo. No entanto, apenas com a utilização de outras metodologias mais sensíveis, como avaliação de quantidade e qualidade de fibras colágenas e testes mecânicos da força de resistência à tensão da ferida, a superioridade deste protocolo no reparo poderia ser confirmada. Uma vez que durante o reparo existe inicialmente a proliferação de tecido de granulação, que se remodela ao longo do tempo, havendo então a diminuição do número de fibroblastos, a avaliação de vários períodos de observação, menores e maiores que os dez dias utilizados em nossa pesquisa, também seria importante para o entendimento do processo.

Embora existam numerosas pesquisas sobre o assunto, e apesar do sucesso da terapia a laser nos estudos em animais e *in vitro*, as bases patofisiológicas que associam o laser e o reparo tecidual ainda não estão completamente esclarecidas e poucos estudos clínicos foram realizados em humanos [24]. Vários mecanismos estão envolvidos na ação do laser na proliferação fibroblástica, como estímulo da produção do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, responsáveis pela contração da ferida, e de outras células do sistema imune que secretam citocinas e fatores de crescimento que afetam fibroblastos [2]. Para que o uso do laser seja rotineiramente recomendado para o reparo de úlceras crônicas em humanos, ainda é necessária a elucidação dos seus mecanismos de ação, com uso de técnicas mais avançadas e realização de ensaios clínicos controlados, com grande número de pacientes para a determinação dos protocolos de tratamento, incluindo número, frequência e duração das aplicações em seres humanos [24].

CONCLUSÃO

Diante da metodologia utilizada pôde-se concluir que laser favoreceu a cicatrização das feridas e que o processo de reparação foi acelerado nos grupos que receberam mais de uma aplicação do laser.

REFERÊNCIAS

1. Mello J, Mello G. Física e aplicações. Laser em Odontologia. 1 ed. São Paulos: Santos; 2001.
2. Walsh L. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. Aust Dent J. 1997;42(4):247-54.
3. Chomette G, Auriol M, Zeitoun R, Mousques T. Effect of the soft laser on gingival connective tissue. II--Effect on wound healing. Optical microscopy, histoenzymology and electron microscopy studies. J Biol Buccale. 1987;15(1):51-7.
4. Longo L, Evangelista S, Tinacci G, Sesti A. Effect of diodes-laser silver arsenide-aluminium (Ga-Al-As) 904 nm on healing of experimental wounds. Lasers Surg Med. 1987;7(5):444-7.
5. Ribeiro M, Da Silva DF, De Araújo C, De Oliveira S, Pelegrini C, Zorn T, et al. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. J Clin Laser Med Surg. 2004;22(1):59-66.
6. Meireles G, Santos J, Chagas P, Moura A, Pinheiro A. 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.
7. Medrado A, Soares A, Santos E, Reis S, Andrade Z. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. J Photochem Photobiol B. 2008;92(3):144-52.
8. Chor A, de Azevedo A, Maiolino A, Nucci M. Successful treatment of oral lesions of chronic lichenoid graft-vs.-host disease by the addition of low-level laser therapy to systemic immunosuppression. Eur J Haematol. 2004;72(3):222-4.
9. Nes A, Posso M. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity lasers. Int Nurs Rev. 2005;52(1):68-72.
10. Kreisler M, Christoffers A, Willershausen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. J Clin Periodontol. 2003;30(4):353-8.
11. Pugliese L, Medrado A, Reis S, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. Pesqui Odontol Bras.17(4):307-13.
12. Woodruff L, Bounkeo J, Brannon W, Dawes K, Barham C, Waddell D, et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. Photomed Laser Surg. 2004;22(3):241-7.
13. Oliveira R, Aarestrup F, Picinini L, Fusaro B. Análise histomorfométrica e avaliação sob microscopia óptica do processo de reparação tecidual em ratos após aplicação de laser de baixa intensidade. Estação Científica. 2006;3:1-10.
14. Hall G, Anneroth G, Schennings T, Zetterqvist L, Rydén H. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. Swed Dent J. 1994;18(1-2):29-34.
15. Demir H, Yaray S, Kirnap M, Yaray K. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. J Rehabil Res Dev. 2004;41(5):721-8.

16. Garcia V, Okamoto T, Kina J. Histologic study of healing process in rat cutaneous wounds treated by laser. *Rev Odontol UNESP*. 1996;25(1):37-48.
17. Mendez T, Pinheiro A, Pacheco M, Nascimento P, Ramalho L. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. *J Clin Laser Med Surg*. 2004;22(1):19-25.
18. Nascimento P do, Pinheiro A, Salgado M, Ramalho L. A preliminary report on the effect of laser therapy on the healing of cutaneous surgical wounds as a consequence of an inversely proportional relationship between wavelength and intensity: histological study in rats. *Photomed Laser Surg*. 2004;22(6):513-8.
19. Pourreau-Schneider N, Soudry M, Remusat M, Franquin J, Martin P. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. *Quintessence Int*. 1989;20(12):887-93.
20. Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol*. 2003;148(2):334-6.
21. Van Breugel H, Bär P. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med*. 1992;12(5):528-37.
22. Anneroth G, Hall G, Rydén H, Zetterqvist L. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1988;26(1):12-7.
23. Conlan M, Rapley J, Cobb C. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol*. 1996;23(5):492-6.
24. Sobanko J, Alster T. Efficacy of low-level laser therapy for chronic cutaneous ulceration in humans: a review and discussion. *Dermatol Surg*. 2008;34(8):991-1000.