

Efeitos do laser GaAlAs associado à microcorrentes na cicatrização por segunda intenção

Effects laser GaAlAs associated with microcurrent in the second intention healing

Kelly Cristina Blaszowski Trombini¹, Davidson Ribeiro Costa², Renata Amadei Nicolau³

¹ Fisioterapeuta, Mestre em Bioengenharia, Universidade do Vale do Paraíba - Univap. São José dos Campos, SP - Brasil.

² Dentista, doutorando em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba - Univap. São José dos Campos, SP - Brasil.

³ Dentista, Doutora em Engenharia Biomédica e Ciências Médicas Básicas e Professora titular na Universidade do Vale do Paraíba - Univap. São José dos Campos, SP - Brasil.

Endereço de Correspondência

Renata Amadei Nicolau

Laboratório de Biomodulação Tecidual - BIOTEC, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP

Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova.

12244-000 - São José dos Campos - SP [Brasil]

rani@univap.br

Resumo

Introdução: A cicatrização de feridas é um processo dinâmico que envolve vários elementos celulares com propósito de restabelecer a funcionalidade do tecido lesado, muitos fatores podem interferir neste processo tornando-o complexo. O laser e a microcorrente são modalidades terapêuticas que otimizam o processo de reparo, porém são estudadas isoladas. **Objetivo:** Investigar a eficácia da associação da fototerapia (laser, GaAlAs, λ 656 \pm 5 nm) com a eletroterapia (microcorrente) na cicatrização por segunda intenção em ratos. **Método:** Foram utilizados 15 ratos submetidos à lesão dorsal direita com 8 mm de diâmetro divididos em três grupos (n=5), nominados de GC (controle), G2 (laser +30 μ A) e G3 (laser +160 μ A). Para análises histopatológicas foi determinado $p \leq 0,05$. **Resultados:** A análise estatística revelou que a área de colágeno apresenta-se estatisticamente superior nos grupos tratados (G2 e G3) quando comparados com o grupo controle. **Conclusão:** A associação das modalidades induz ao aumento do colágeno na fase inicial do reparo tecidual.

Descritores: Terapia a laser de baixa intensidade; Eletroterapia; Cicatrização de feridas.

Abstract

Introduction: Wound healing is a dynamic process that involves multiple cellular elements with the purpose of restoring the functionality of the injured tissue. Many factors can interfere with this process, making it complex. Laser and microcurrent are therapeutic strategies that optimize the repair process, but have been studied in isolation. **Objective:** To investigate the efficacy of combining phototherapy (laser, GaAlAs, λ 656 \pm 5 nm) with electrotherapy (microcurrent) on second intention healing in rats. **Methods:** We used 15 rats with 8 mm in diameter lesions in the right dorsal. The rats were divided into three groups (n = 5): the CG (control group), G2 (laser+30 μ A) and G3 (laser +160 μ A). For histopathological analysis $p \leq 0.05$ was determined. **Results:** Statistical analysis revealed that the area of collagen was statistically higher in the treated groups (G2 and G3) compared with the control group. **Conclusion:** A combination of methods induces increased collagen in the initial phase of tissue repair.

Keywords: Low-level laser therapy; Microcurrent; Tissue healing.

Introdução

Mediante um dano (físico, químico ou biológico) no tecido biológico observa-se como resposta uma série de eventos, que tem por finalidade promover a restauração tissular. Este processo de reparo pode ocorrer de duas formas através da regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido, ou pela cicatrização com restabelecimento da homeostasia e formação de tecido fibroso com perda total ou parcial de atividade funcional¹.

As feridas podem ter a cicatrização por primeira intenção como as feridas cirúrgicas ou por segunda intenção como as úlceras (traumáticas, diabéticas e vasculares). Por apresentarem um processo cicatricial lento o tratamento de feridas é um assunto de interesse para muitos profissionais e há um crescente desafio para que propostas de tratamento venham a contribuir para otimizar a recuperação da lesão².

Vários recursos terapêuticos são empregados para controlar e limitar os efeitos negativos da inflamação por proporcionar o ambiente ideal para que a cicatrização ocorra. Procedimentos como a estimulação direta com corrente alternada de baixa frequência, corrente de alta voltagem, ultrassom e laser têm sido considerados facilitadores da cicatrização³.

Ayyildiz et al. (2015)⁴ e Garcez et al. (2012)⁵ relatam que a fototerapia produz efeito bioestimulador. Por isso, diferentes fontes luminosas, comprimentos de onda, doses e protocolos de aplicação, têm sido estudados visando acelerar o processo de reparo tecidual em feridas cutâneas^{6,7}. Outra forma de intervenção, comumente usada para tratar feridas crônicas, é a estimulação elétrica por microcorrentes. A justificativa para a utilização deste método é baseada no fato de que o corpo humano apresenta um sistema endógeno bioelétrico que melhora a cicatrização de lesões de tecidos moles. Mediante interrupção do sistema bioelétrico, níveis terapêuticos de corrente elétrica podem ser doados na ferida. Tais sinais bioelétricos compensam a bioeletrici-

dade que está diminuída no tecido lesado, auxiliando no processo de reparo⁸.

As contribuições da laserterapia e da estimulação elétrica por microcorrentes sobre o reparo tecidual são vastamente relatadas na literatura, porém os estudos são abordados de forma comparativa ou isolada. Diante deste contexto e por ser um assunto que não foi abordado anteriormente justifica-se a necessidade de elucidação da contribuição da associação da terapia laser e da terapia com microcorrente no processo de reparo tecidual.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 15 ratos adultos jovens, machos, da linhagem Wistar (250 ± 20 g). Os aspectos éticos deste estudo seguiram as premissas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (Univap), com protocolo de aprovação de número A14/CEP/2010.

Os 15 animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=5), denominados: GC, grupo controle em que os animais receberam o tratamento com os equipamentos desligados; G2, grupo no qual os animais foram tratados com laser GaAlAs associado à microcorrentes com intensidade de 30µA e G3, grupo no qual os animais foram tratados com laser GaAlAs associado à microcorrentes com intensidade de 160 µA.

Indução da lesão

Todos os animais, após serem pesados, receberam a administração de um pré-anestésico Torbugesic (2mg/Kg) associado à Acepran (1mg/kg). Ambos os fármacos foram administrados em dose única, via intramuscular. Após 15 minutos instituiu-se o anestésico Zolazepan e Tiletamina (40mg/Kg) via intramuscular. Após

a anestesia realizou-se uma lesão circular com auxílio de instrumento para biópsia tipo *punch* (8mm) na região dorsal direita, onde foi previamente tricomizada (figura 1).

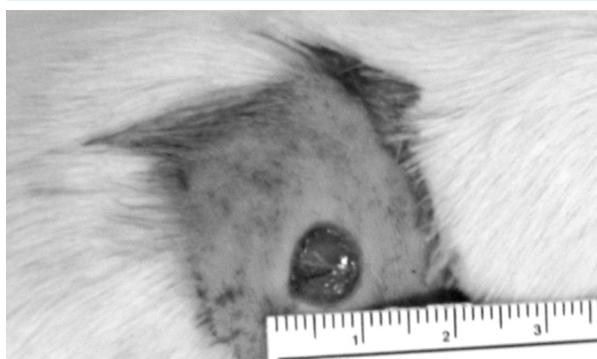


Figura 1: Lesão dorsal produzida experimentalmente com bisturi circular (*punch*)

Terapia laser associada à microcorrente

Imediatamente após o procedimento cirúrgico os animais do grupo G2 foram submetidos à terapia com laser e posteriormente a microcorrente com intensidade de 30 μA e os animais do grupo G3 com intensidade de 160 μA . A aplicação foi única e diária na região dorsal, totalizando 30 minutos de tratamento por um período de 7 dias.

O laser Arseneto de Gálio-Alumínio (GaAlAs, λ 656 \pm 5 nm), em modo contínuo, foi aplicado de forma pontual e em contato com a pele. Os parâmetros de irradiação empregados foram: energia de 1,56 J, densidade de energia de 2 J/cm², potência de 0,02 W, área do feixe de 0,78 cm² e tempo 78 segundos. Os eletrodos do equipamento emissor de microcorrentes foram posicionados na forma quadripolar com o primeiro canal ajustado a uma frequência de 0,3 Hz e largura de pulso de 1,6 s e o segundo em 0,8 Hz e pulso de 1,0 s.

Os animais do GC não sofreram nenhum tipo de terapia, porém foram manipulados com os equipamentos (laser e microcorrentes) des-

ligados. Sete dias pós-lesão os animais foram anestesiados e eutanasiados com dose letal de cloreto de potássio a 10% (KCl 0,4 ml/100g de peso corpóreo) via intra-cardíaca.

Análise histológica

Para cada grupo foram avaliadas quinze lâminas histológicas contendo seis cortes semi-seriados os quais foram identificados com letras A, B, C, D, E e F para sequência de análise da região mediana do corte através de campo superficial - derme superficial (epiderme e anexos) e campo profundo - derme profunda (limite entre a derme e o tecido subcutâneo), avaliados por microscopia óptica e captura digital.

A captura digital das imagens foi realizada por meio de máquina fotográfica digital (modelo Coolpix E5400) acoplada a um microscópio binocular.

Para a captura das imagens foi usada uma objetiva de (40x/0.65), armazenadas em formato JPEG para posterior análise no programa ImageJ®. Foi quantificado o número de células inflamatórias, o número de fibroblastos, o número de vasos neoformados e a área de colágeno. O quadrante de área analisada correspondeu a 43.200 μm^2 .

Para determinar a área de estudo (43.200 μm^2) o programa Image J® foi calibrado sobre uma graticula micrometrada respeitando as mesmas condições de aquisição das imagens das amostras.

Descrição da estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise dos dados obtidos foi utilizado o programa GraphPad Prism®, comparando-se os diferentes grupos experimentais. Após o teste de normalidade, Kolmogorov-smirnov, foi utilizado o teste paramétrico ANOVA (análise de variância) com pós-teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para análise dos dados (número de células inflamatórias, número

de fibroblastos, número de vasos neoformados e área de colágeno).

Resultados

Nas regiões da derme, tanto superficial quanto profunda, analisou-se o número de vasos sanguíneos, o número de células inflamatórias e o número de fibroblastos presentes no GC, G2 e G3. Na tabela 1 é possível observar um ligeiro aumento do número de vasos sanguíneos na região superficial e a diminuição das células inflamatórias (na região profunda) e do número de fibroblastos, tanto da região superficial como da região profunda, nos grupos tratados (G2 e G3) quando comparados ao grupo controle.

No entanto, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas entre os grupos G2 e G3, conforme demonstra a tabela 2.

Área de colágeno

No que concerne à análise da área de colágeno, é observado um aumento da área superficial e profunda nos grupos experimentais, mas apenas os dados da área de colágeno profundo apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação ao GC (tabela 3).

Tabela 2: Resultado da análise da variância (ANOVA) entre os grupos para o número de células e vasos

Variável (número)	Valor p^1 calculado	Grau significância
Vasos sanguíneos superficial	0,1447	ns
Vasos sanguíneos profundo	0,3244	ns
Células inflamatórias superficial	0,0856	ns
Células inflamatórias profundo	0,2966	ns
Fibroblastos superficial	0,5143	ns
Fibroblasto profundo	0,3552	ns

*ns= não significativo $p > 0,05$; 1=Valor p em relação ao grupo controle.

Tabela 3: Resultado da análise da variância para a área de colágeno.

Área (mm ²)	valor p calculado	grau significância
Colágeno superficial	0,1671	ns
Colágeno profundo	0,0037	s

ns = não significativo $p > 0,05$;
s = significativo $p < 0,05$

Área de colágeno profundo

Na figura 2 é possível observar amostras histológicas da região profunda da derme.

Tabela 1: Resultados dos parâmetros analisados no sétimo dia do processo de reparo. Dados expressos em média \pm erro padrão

Parâmetros de análise	Grupos						
	GC		G2		G3		
	Superficial	Profundo	Superficial	Profundo	Superficial	Profundo	
Número	Vasos sanguíneos	1,8 \pm 0,2	1,9 \pm 0,6	3,4 \pm 0,5	2,7 \pm 0,5	2,6 \pm 0,5	1,5 \pm 0,3
	Cel. Infamatórias	19,2 \pm 5,0	19,7 \pm 6,0	21,6 \pm 3,4	13,4 \pm 2,0	9,2 \pm 1,9	10,7 \pm 2,2
	Fibroblastos	5,9 \pm 1,3	5,1 \pm 0,4	4,6 \pm 0,8	4,0 \pm 1,1	4,1 \pm 0,9	3,2 \pm 0,5
Área	Colágeno (mm ²)	128,9 \pm 25,6	97,9 \pm 14,0	160 \pm 8,1	154,5 \pm 10,2	178,0 \pm 5,9	194,5 \pm 16,8

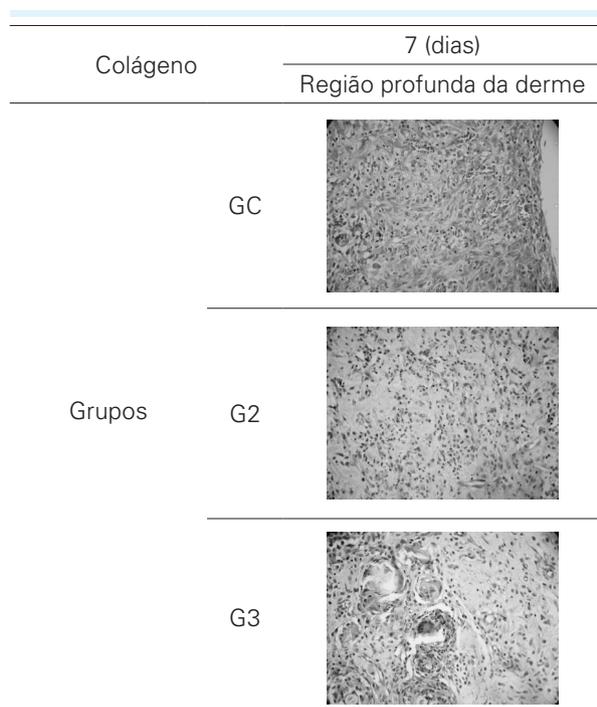


Figura 2: Amostras histológicas da região profunda da derme (400x). GC= Controle, G2= laser +30µA, G3= laser +160µA

A figura 3 representa o histograma da área histológica do colágeno na região profunda da derme, demonstrando resultados estatisticamente significantes em relação ao GC, denotando maior área de colágeno nos grupos G2 e G3. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos G2 e G3.

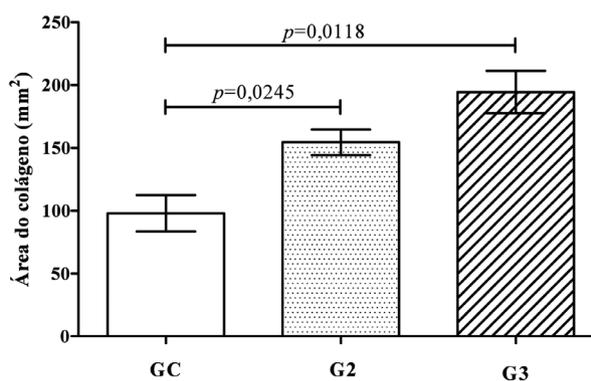


Figura 3: Histograma da área de colágeno na derme profunda do grupo C vs G2 vs G3. Valores expressos média ± erro padrão.

Discussão

O laser e a microcorrentes são recursos terapêuticos que têm sido investigados e aplicados para otimização do processo de cicatrização. Dentre os processos celulares estimulados pela terapia a laser de baixa intensidade podem ser citados: aceleração do processo de reparo, aumento da síntese de colágeno, redução do tempo de reparo e incremento da tensão na cicatriz⁹. Por outro lado, estudos demonstram que a microcorrente aumenta a produção de adenosina trifosfato (ATP) e propicia a proliferação de fibroblastos^{10, 11, 12, 13, 14}, com conseqüente aceleração processo de reparo¹⁵. Porém, nota-se que os estudos envolvem as terapias em separado ou em comparativo, tanto em nível clínico quanto experimental. Contudo, a associação não foi reportada, justificando o estudo em animais previamente ao clínico.

O objetivo desta pesquisa foi verificar a eficácia da associação do laser e microcorrente na fase inicial do processo de reparo tecidual por segunda intenção em modelo animal avaliando a influência destas terapias nos elementos: células inflamatórias, fibroblastos e área de colágeno.

As células inflamatórias estão presentes na ferida logo após a lesão. Em cerca de 3 dias inicia-se a formação do tecido de granulação, sendo este o ponto de referência para o reparo tecidual, sua característica histológica consiste na formação de novos vasos e proliferação de fibroblastos. No período de 5 a 7 dias a ferida esta preenchida por este tecido e a neovascularização atinge seu ponto máximo caracterizando a fase inicial do processo de reparo¹⁶. Devido a este fato o presente estudo avaliou o período de 7 dias após a lesão.

O laser no espectro do vermelho foi elencado por ser a faixa mais utilizada em reparo tecidual cutâneo, região do espectro eletromagnético correspondente à faixa de 620 a 740 nm. A terapia a laser de baixa intensidade nesta faixa produz efeitos importantes na fase inicial do reparo como a diminuição da migração de célula-

las inflamatórias, redução do edema, aumento do número de fibroblastos com redução da área de lesão¹⁷.

Carvalho et al. (2010)¹⁸ estudaram a ação do laser na região do vermelho no processo de reparo inicial e constataram redução do processo inflamatório bem como maior síntese de colágeno favorecendo o reparo tecidual. A quantificação da área de colágeno foi maior nos grupos tratados em relação ao controle denotando maior síntese nestes grupos, corroborando com este achado estão os estudos de Medrado et al. (2008)¹⁹ Busnardo e Biondo-Simões (2010)²⁰; e Silveira et al., (2011)²¹.

O estudo não demonstrou diferença significativa entre os grupos nos parâmetros avaliados quanto ao número de células inflamatórias, vasos sanguíneos e fibroblastos apesar desta ausência de diferença significativa, nenhum efeito negativo foi encontrado corroborando com o estudo de Byl et al. (1994)²² que ao aplicarem a corrente microamperada na intensidade de 100 μ A, no período de cinco dias, não constataram aceleração do processo de reparo, porém nenhum efeito negativo ocorreu com a aplicação desta modalidade. Conforme demonstra a figura 4 no presente estudo os grupos tratados em associação quando comparados com o controle apresentaram uma redução das células inflamatórias, sendo mais expressivo para o grupo tratado com intensidade de 160 μ A associado ao laser (47,92%). Estudos envolvendo estas terapias demonstraram resultados similares^{14, 23, 24}.

Silva (2006)¹³ e Dall'agnol (2009)²⁵ estudaram a terapia com microcorrente e com laser, respectivamente e verificaram que ambas as terapias foram eficazes na redução do infiltrado inflamatório, porém tal achado foi mais expressivo com o uso da microcorrente. Demir et al. (2004)²⁶ enfatizaram que ambas as terapias são eficazes no processo de reparo²⁷, porém a microcorrente apresenta resultados mais expressivos na fase inflamatória, com redução na duração da fase e decréscimo em relação as células polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos quan-

do comparado com o laser. Respostas proliferativas e de síntese podem ocorrer no mesmo sinal dependendo do estado do tecido no momento da estimulação. Kitchen (2003)²⁸ ressalta que os tecidos incluem em sua estrutura moléculas de proteínas de cadeias longas como colágeno, elastina e queratina e que todas as proteínas possuem uma característica elétrica comum, sendo capazes de interpretar a intensidade e frequência do estímulo imposta no tecido.

Os efeitos da estimulação tecidual têm sido centrados na resposta dos fibroblastos em acelerar o processo de reparo^{1, 7, 10, 20}. Verificou-se um aumento na síntese dos fibroblastos tanto para o G2 (77,97%) quanto para o G3 (69,49%) em relação ao GC. O laser e o microcorrente são recursos amplamente utilizados para acelerar o processo de reparo tecidual. As terapias quando utilizadas em associação apresentaram resultados positivos, porém não apresentam sinergismo de potencialização²⁷. Os resultados foram mais evidentes quando os recursos foram utilizados em estudos de forma isolada.

Considerando-se que clínicas de reabilitação comumente contam com equipamentos de microcorrentes e/ou laser e por serem recursos terapêuticos de custo relativamente baixo, estes podem contribuir na recuperação de tecidos proporcionando melhores condições para que o processo de reparo aconteça objetivando uma melhor qualidade de vida aos portadores de feridas podendo assim ser incorporados também em Serviços Públicos.

Conclusão

A aplicação conjunta da corrente elétrica microamperada (quadripolar, com frequência de 0,3 Hz e 0,8 Hz, intensidade de 30 μ A ou 160 μ A) associada ao laser Arseneto de Gálio Alumínio (λ 656 \pm 5 nm) no processo inicial do reparo tecidual em feridas cutâneas em ratos demonstraram, por meio da análise histológica, aumento da área de colágeno.

Referências

- Ruh AC, Fernandes D, Artoni RF, Favero GM. Inflamação: entre a regeneração e a cicatrização. Revista Publicatio UEPG: Ciências Biológicas. 2013;19(1):11-19.
- Watson T. Regulation of tissue repair and regeneration fields. Chinese Journal of Traumatology. 2010;13(1):55-61.
- Brasileiro Filho G. Bogliolo Patologia Geral. 5 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2013.
- Ayyildiz S, Emir F, Sahin C. Case Reports in Dentistry. Evaluation of Low-Level Laser Therapy in TMD Patients. 2015;2015(ID 424213):1-6.
- Garcez AS, Ribeiro MS, Núñez SC. Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier; 2012.
- Ferreira CLB, Nicolau RA, Oliveira MA, Costa DR, Prianti Júnior ACG. Low level LED therapy ($\lambda = 945 \pm 20$ nm) effect on epithelial tissue of diabetic rats during repairing process. Research on Biomedical Engineering. 2013;29(4):404-13.
- Chaves MEA, Araújo AR, Piancastelli ACC, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2014;89(4):616-23.
- Potawski, L, Watson T. Bioelectricity and microcurrent therapy for tissue healing – a narrative review. Physical Therapy. 2009; 14(2):104-14.
- Lins RDAU, Dantas EM, Lucena KCR, Catão MHCV, Granville AF, Carvalho Neto LG. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2010;85(6):849-55.
- Yu C, Hu ZQ, Peng RY. Effects and mechanisms of a microcurrent dressing on skin wound healing: a review. Military Medical Research. 2014;24(1):1-8.
- Bayat M, Asgari-Moghadam Z, Maroufi M, Rezaie FS, Bayat M, Rakhshan M. Experimental wound healing using microamperage electrical stimulation in rabbits. Journal of Rehabilitation Research Development. 2006;43(2):219-26.
- Sugimoto M, Maeshige N, Honda H, Yoshikawa Y, Uemura M, Yamamoto M, Terashi H. Optimum microcurrent stimulation intensity for galvanotaxis in human fibroblasts. Journal Wound Care. 2012;21(1):5–10.
- Silva CR. Efeito da corrente elétrica de baixa intensidade em feridas cutâneas de ratos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade Vale do Paraíba, São José dos Campos: 2006.
- Gaspi FOG, Foglio MA, Carvalho JE, Gláucia Maria T. Santos GMT, Testa M, Passarini Jr JR, E et al. Effects of the topical application of hydroalcoholic leaf extract of *Oncidium flexuosum Sims*. (Orchidaceae) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011; 1-9.
- Talebi G, Torkaman G, Firoozabadi M, Shariat S. Effect of anodal and cathodal microamperage direct current electrical stimulation on injury potential and wound size in guinea pigs. Journal of Rehabilitation Research Development. 2008;45(1):153-60.
- Fausto N, Kumar V, Abbas AK. Robbins e Conran – Patologia. Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. São Paulo: Elsevier; 2010.
- Piva JC, Abreu EMC, Silva VSS, Nicolau RA. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. Anais Brasileiro Dermatologia. 2011;86(5):947-54.
- Carvalho KC, Nicolau RA, Maia ALM, Barja PR, Pereira de Sá H, Santo LAE, E et al. Estudo da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com fototerapia a laser. ConScientiae Saúde. 2010;9(2):179-86.
- Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SR, Andrade ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. Journal of Photochemistry and Photobiology B. 2008;92(3):144–52.
- Busnardo VL, Biondo-Simões MLP. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. Revista Brasileira Fisioterapia Sao Carlos. 2010;14(1):45-51.
- Silveira PC, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. Lasers Medicine Science. 2011;26(1):125-31.

22. Byl NN, McKenzie AL, West JM, Whitney JD, Hunt TK, Hopf HW, E et al. Pulsed microamperage stimulation: a controlled study of healing of surgically induced wounds in yucatan pigs. *Physical Therapy*. 1994;74(3):201-13.
23. Rocha Júnior AM, Oliveira RG, Farias RE, Andrade LCF, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *Anais Brasileiro Dermatologia*. 2006;81(2):150-56.
24. Ahmed AF, Elgayed SSA, Ibrahim IM. Polarity effect of microcurrent electrical stimulation on tendon healing: Biomechanical and histopathological studies. *Journal of Advanced Research*. 2012;3:109-17.
25. Dall Agnol MA, Nicolau RA, de Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Medicine Science*. 2009;24(6):909-16.
26. Demir H, Balay H, Kirnap M. A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats. *Journal of Rehabilitation Research & Development*. 2004;41(2):147-54.
27. Freitas RPA, Macedo AB, Oliveira AR, Ramos AMO, Vieira WH. Comparative study of Low-level laser therapy and microcurrent on the healing of skin burns in rats. *Acta Scientiarum. Health Sciences*. 2014;36(1):5-10.
28. Kitchen S, Young S. *Eletroterapia Prática Baseada em Evidências*. Barueri: Manole; 2003.



