

Evaluación de los efectos del LED en el Tejido Dérmico de Ratones.

Esteban Fortuny P¹, Andreza Michelline Soares F², Alessandro Freire M², Patricia Cristina Cabral MB³, Patricia Froes M⁴, Ma. Goretti Freire C⁵, Monick Aby Faraj L², Oscar R⁶, Rodrigo Marcel Valentim S⁷, Hennes Gentil A⁸, Jose Queiroz F⁹.

¹Kinesiólogo, Universidad Finis Terrae (Santiago, Chile); ²Fisioterapeuta graduada de la Universidad Potiguar (Natal/RN); ³Fisioterapeuta graduada del Centro Universitário do Rio Grande do Norte (Natal/RN); ⁴Doctora en Ciencias de la Salud de la Universidad Federal de Rio Grande do Norte (Natal/RN), Docente do Curso de Fisioterapia de Universidad Potiguar (Natal/RN) y de la Facultad Natalense para o Desenvolvimento do Rio Grande do Norte (Natal/RN); ⁵Doctora en Patología Clínica de la Universidad Federal do Rio Grande do Norte- UFRN; ⁶Licenciado Universidade Maimondes, (Buenos Aires, Argentina); ⁷Mestre em Fisioterapia pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Natal-RN); ⁸Mestrando en Ciencias de la Salud por la Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Natal/RN); ⁹Mestre em Ciências da Saúde, Docente da Universidade Potiguar (Natal-RN).

Resumen

Diodos Emisores de la Luz- Light Emitting Diodes (LED) son fuentes de luz que están siendo introducidos en los tratamientos del envejecimiento. El objetivo del estudio fue evaluar los efectos del LED rojo en la dermis de ratones wistar. Se trata de un estudio experimental controlado y randomizado, fueron utilizados 20 ratones wistar divididos en cinco grupos. Los grupos fueron: G1 en donde se aplicó 10 sesiones de diez minutos de fototerapia por LED. El G2 con 20 sesiones de 10 minutos, el G3 con 10 sesiones de 20 minutos, el G4 con 20 sesiones de 20 minutos y el G5 fue el grupo control. Después de las aplicaciones se recolectó el material biológico de la zona, siendo realizado el análisis histológico de las áreas que recibieron las aplicaciones, sometiénolas a las coloraciones de HE, tricómico de Masson y Verhoef. Fue observada la presencia de micro vasos dérmicos con resultados significativos entre el G2 y el G5. Con relación a la presencia de mastocitos hubo resultados significativos entre el G1 y el G3. El análisis de las fibras elásticas presentó resultados significativos en los grupos G1, G2, G3, G4 en comparación al grupo control (G5). La evaluación de los efectos del LED en las fibras colágenos, los grupos tratados comparados al grupo control no presentaron ninguna diferencia significativa.

Palabras claves: Modalidades en Fisioterapia, Fototerapia, Tejido Con-juntivo, Tejido Elástico.

Summary

The Light-Emitting Diodes Light Emitting Diodes (LED) are a source of light which are being introduced into the treatment of aging process. This study evaluate the effect of application of red LED on the dermis of Wistar rats. Twenty Wistar rats were used in this randomized controlled experimental study. Those rats were divided randomly into five groups. The G1 group underwent ten sessions of phototherapy by LED lasting ten minutes each. The G-2, 20 sessions of 10 minutes, the G-3, 20 minutes, the fourth group, 20 sessions of 20 minutes and the G-5 group was the control group. After the application, the biological material was collected and the histological analysis of the areas that suffered application were done, being subjected to HE staining, and Masson trichrome & Verhoef. It was observed the presence of dermal microvascular, with significant results among G2 and G5 groups. Regarding the presence of mast cells, significant results were observed among G1 and G3 groups, however, that was not the case with the G5. By analyzing the elastic fibers, significant results were observed among G1, G2, G3, G4 groups, but the same results weren't observed in the fifth group. Regarding the assessment of the effects of LED on the collagen fibers, the treated groups, when compared to the control group, showed no significant difference.

Key words: Physical Therapy Modalities, Phototherapy, Connective Tissue, Elastic Tissue.

Introducción

La preocupación con la apariencia física existe desde la antigüedad y las tentativas del hombre en interferir en las alteraciones de la integridad de la piel empezaron con la utilización de técnicas simples para mejorar el aspecto físico y el vigor de la piel¹.

En los últimos años, los métodos terapéuticos han sido perfeccionados, no sólo por la implantación de nuevas tecnologías y su avance, sino también por la importancia otorgada a la salud, apariencia física y consecuentemente una búsqueda más grande de longevidad².

Gran parte de las imperfecciones de la piel, como arrugas, estrías y flacidez, entre otras, son consecuencia de alteraciones fisiológicas y/o pérdida de la integridad del tejido conjuntivo en función de la edad. Lo anterior ha estimulado a los investigadores a buscar métodos cada vez menos invasivos para ser aplicados en la medicina estética, a fin de recuperar las estructuras funcionales de la dermis².

La aplicación de Diodo Emisor de la Luz (LED) en diferentes longitudes de onda por profesionales de la salud tuvo un crecimiento considerable en la última década, haciendo que este recurso ocupe una posición destacada en el área de la dermatología. La aplicación de ésta y otras modalidades terapéuticas, acaban con la forma empírica de los tratamientos actuales³.

El LED es un dispositivo semiconductor que emite luz cuando una tensión es aplicada. Es un componente electrónico moderno semejante al laser de diodo (laser semiconductor), utilizado en diversas áreas, como en la laserterapia de baja intensidad, lectores de código de barra, semáforos, paneles de anuncios, móviles, etc. La luz emitida por un LED es de tipo divergente y no coherente, sin embargo, aunque no sea monocromático, su espectro de emisión es más bien estrecho, comparado al de la luz común⁴.

Su mecanismo de acción es por foto estimulación o foto ondulación, tiene efectos sobre la célula, su permeabilidad, sobre las mitocondrias estimulando la síntesis del ATP y en las proteínas como colágeno y elastina. Esa luz actúa también como agente antimicrobiano y antiinflamatorio, por esto es indicada para variadas afecciones inflamatorias. Las fuentes de láser y de LED son semejantes del punto de vista de la luz emitida, o sea, ambas producen una banda espectral relativamente estrecha, en tanto que el LED tiene un espectro un poco más largo. Así el LED está siendo una buena alternativa para mejorar la cicatrización de heridas. Por otro lado, el bajo costo del LED en relación al láser aumentó la demanda y el uso de este equipamiento⁵.

Aunque en la práctica clínica se demuestra una elevada utilización de ese recurso, la literatura presenta una escasa cantidad de estudios aclarando los efectos del LED sobre el tejido dérmico. El presente estudio busca investigar los reales efectos del LED en el tejido dérmico de ratones.

Materiales y métodos

Se trata de un estudio experimental controlado y randomizado, en el cual fueron analizados los efectos del LED rojo en el tejido dérmico de ratones wistar. El proyecto fue analizado y aprobado por el comité de ética en investigación, de la Universidad Potiguar- UnP, cuyo número del protocolo es 046/2009 cumpliendo todos los requisitos de la resolución 196/96 y sus complementarios emitidos por el consejo Nacional del Salud/MS.

Para este estudio fue organizada una muestra de 20 ratones wistar (*Ratones Norvegicus Albinus*) pesando entre 250 y 300g, todos del sexo masculino, siendo subdivididos en cinco grupos de cuatro animales. Todos los animales fueron procedentes del vivero de la Universidad Potiguar.

Materiales

Los materiales que fueron utilizados en la investigación fueron: equipamiento Biolight de fabricante Demox Electromédica, termómetro digital, cajas para contención de ratones, cámara fotográfica digital de 5.0 Mega pixeles, material quirúrgico para la realización de la biopsia de ratones, anestésico, bisturí y material para el análisis histopatológico (microscopio y láminas).

Descripción de los métodos

Todos los animales fueron sometidos a un ayuno de doce horas y posteriormente fueron anestesiados con uso de anestésico (Zoletil 50) por vía intramuscular, en el cuádriceps izquierdo, la dosificación calculada utilizada fue de acuerdo con el peso del animal (50.0 a 75.0 mg/kg). En seguida, fue realizada la tricotomía y asepsia en el abdomen del animal para las aplicaciones de fototerapia por LED realizada a 90° de la zona de tratamiento de acuerdo con la ley del coseno de Lambert, sin contacto con la piel, utilizando una potencia de 3 watts. La aplicación fue diaria, con duración de 10 y 20 minutos para cada aplicación.

Los grupos fueron divididos en: G1 en donde fue aplicado 10 sesiones de diez minutos de fototerapia por LED, el G2 con 20 sesiones de 10 minutos, el G3 10 sesiones de 20 minutos, el

G4 con 20 sesiones de 20 minutos y el G5 fue el grupo control. Todos los animales fueron sacrificados después de 11 y 21 días de aplicación.

Después del sacrificio en cámara de CO₂, fue recogido mediante bisturí un fragmento de la piel ubicada en el abdomen de todos los animales tratados, específicamente de la zona tratada. En seguida de este procedimiento, los fragmentos fueron colocados en frascos apropiados y debidamente identificados conteniendo 20 ml. de solución de formol al 10%. Después de 24 horas de fijación, las muestras fueron dirigidas al laboratorio de patología para su procesamiento histológico. Fueron incluidas en parafina, cortadas en micrófono rotativo con 4 micrómetros y sometidos a la coloración de hematoxilina-eosina (HE), utilizada para la visualización de las alteraciones histológicas de los procesos inflamatorios, evaluados mediante la presencia de mastocitos, y que también permite apreciar fibras colágenas. También se utilizó la tinción Tricrómica de Masson para la visualización de fibras colágenas en azul y la de Verhoeff para visualizar fibras elásticas.

Análisis Histológicos

Después de la confección de las láminas, estas fueron examinadas por un patólogo de manera ciega, en microscopio óptico Olympus. Micro fotografías fueron realizadas con cámara digital acoplada al microscopio.

Para evaluación de los datos hallados fueron creadas tablas en excel, donde fueron insertados los resultados y tabulados para análisis estadístico. El programa estadístico utilizado fue InfoSoft 2002 y el test aplicado fue T de Student.

Resultados

Inicialmente, en la evaluación de los efectos del LED en las fibras colágenas, los grupos tratados comparados al grupo control no presentaron ninguna diferencia significativa. Al contabilizar en cada campo de análisis histológico la cantidad de fibras colágenas, la cantidad existente en las láminas tratadas fue muy próxima al hallado en las láminas del grupo control, evaluado a través de las coloraciones de HE con aumento de 100x (Figuras 1a y 1b) y Tricrómico de Masson (100x), como muestran las figuras 1c y 1d.

En los cortes histológicos de los animales sometidos a fototerapia por LED, se observó la presencia de micro vasos dérmicos. En el primer grupo (G1) que tuvo diez aplicaciones de diez minutos, la media de micro vasos encontrados en los cortes histológicos fue de 5,35; en el segundo grupo (G2) que recibió diez aplicaciones de veinte minutos, la media de micro vasos

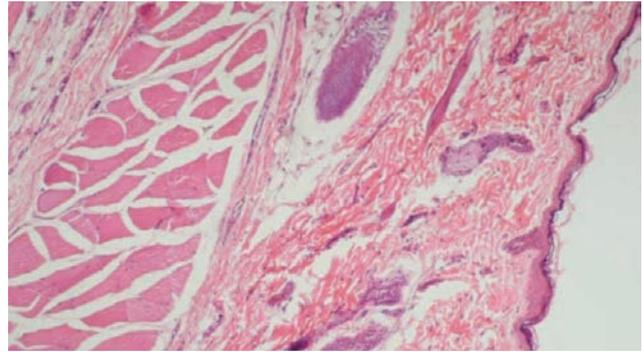


Figura 1a

Foto micrografía de animal del grupo control mostrando la presencia de fibras colágenas en el área demarcada – HE 100x.

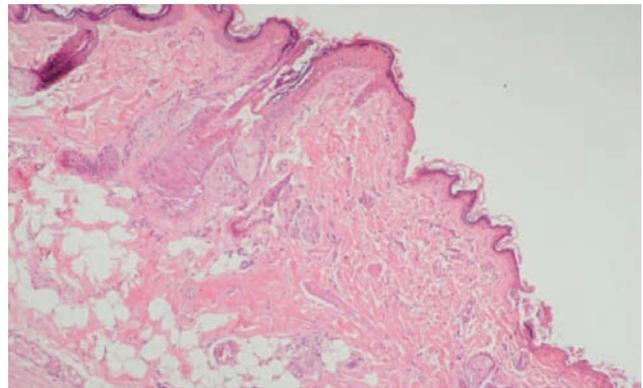


Figura 1b

Fotomicrografía de animal del G1 mostrando la presencia de fibras colágenas en el área demarcada – HE 100x

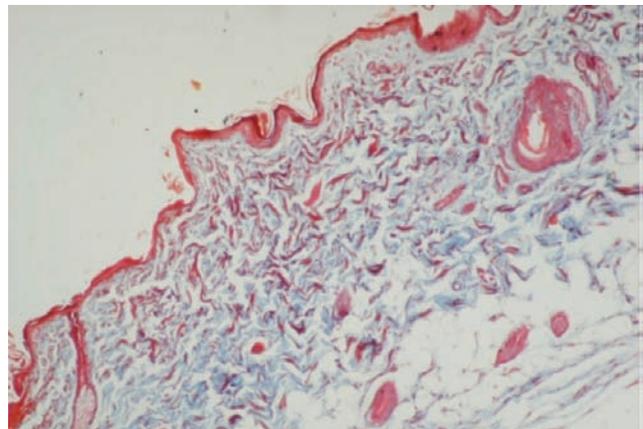


Figura 1c

Fotomicrografía de animal del grupo control mostrando la presencia de fibras colágenas en el área demarcada – Tricrómico de Masson 100x.

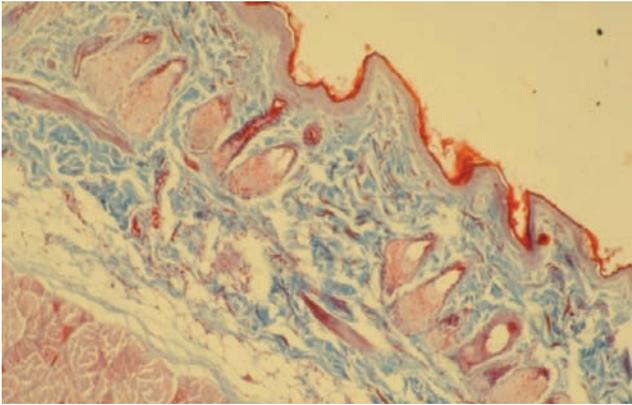


Figura 1d

Fotomicrografía de animal del G-2 grupo tratado mostrando la presencia de fibras colágenas en la área demarcada – Tricrómico de Masson 100x.

dérmicos encontrados fue de 5,95; el tercer grupo (G3) con diez aplicaciones de veinte minutos, la media de micro vasos encontrados fue de 5,3 y el cuarto grupo (G4) con veinte aplicaciones de veinte minutos la media de micro vasos encontrados fue de 4,35. En el grupo clasificado como control (G5) la media de micro vasos encontrados en los cortes histológicos fue de 4,35. Cuando se evaluó entre los grupos la formación de micro vasos dérmicos, excepto con relación al grupo control, no fueron observadas diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$) como muestra la Figura 2a.

Al evaluar los grupos sometidos a fototerapia por LED tomando en consideración el tiempo y el número de aplicaciones con relación al grupo control se observó significancia estadística ($p < 0,05$) en relación al G2, que experimentó veinte sesiones de diez minutos versus el grupo controle, como muestra la Figura 2b. Se ha notado que el número de sesiones no influencia en la proliferación de nuevos vasos y si el tiempo de aplicaciones de las mismas.

Los mastocitos son un importante componente de la respuesta inmune celular, estando presente en los procesos de cicatrización. En el análisis de las células inflamatorias se ha notado que en los animales sometidos a fototerapia por LED en el grupo 1, la media de estas células presentes en los cortes histológicos fue de 28,5, en el grupo 2 la media fue de 36,75, en el grupo 3 la media fue de 45,25, en el grupo 4 la media fue de 33,75 y el grupo control fue de 34. Al verificar la diferencia de estos resultados hubo diferencia significativa entre los grupos 1 y 3 ($p < 0,05$) como muestra la figura 3a. Sin embargo, al evaluar las medias entre los grupos sometidos a fototerapia y el grupo control, no hubo resultados estadísticamente signifi-

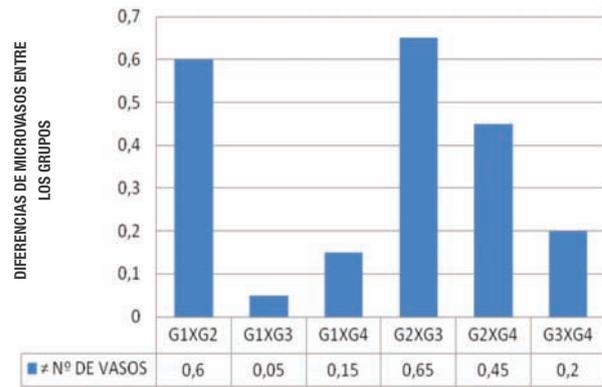


Figura 2a

La figura muestra la diferencia de micro vasos dérmicos en los cortes histológicos de los grupos de animales sometidos a fototerapia por LEDs.

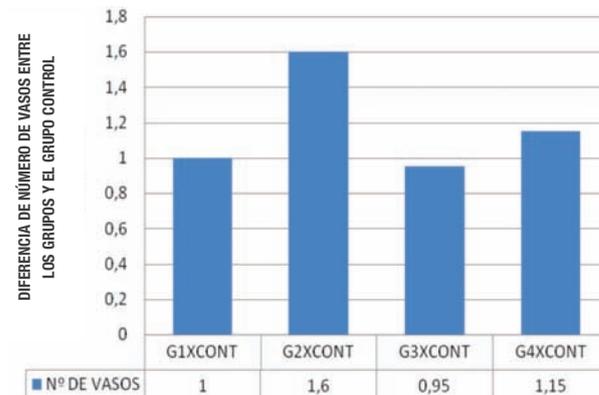
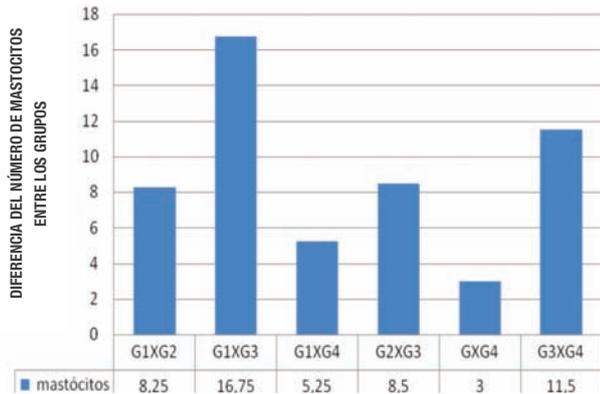


Figura 2b

La figura muestra la diferencia de micro vasos dérmicos en los cortes histológicos de los grupos de animales sometidos a la fototerapia por LEDs en relación al grupo control.

cativos como muestra la figura 3b.

Al analizar la media de fibras elásticas de los cortes histológicos de los grupos de animales sometidos a fototerapia por LED, mediante la coloración de Verhoeff, fueron hallados los siguientes resultados; grupo 1, media de 22,85; grupo 2, media de 27,30; grupo 3, media de 30,25; grupo 4, media de 29,70 y el grupo control fue de 14,20. Al evaluar estadísticamente la media de la presencia de fibras elásticas entre los grupos, presentaron resultados significativos ($p < 0,05$) entre los grupos 1 y 2; 1 y 3; 1 y 4 como muestra la Figura 4a.

**Figura 3a**

La figura muestra la diferencia entre el número de mastocitos visualizados en cortes histológicos entre los grupos.

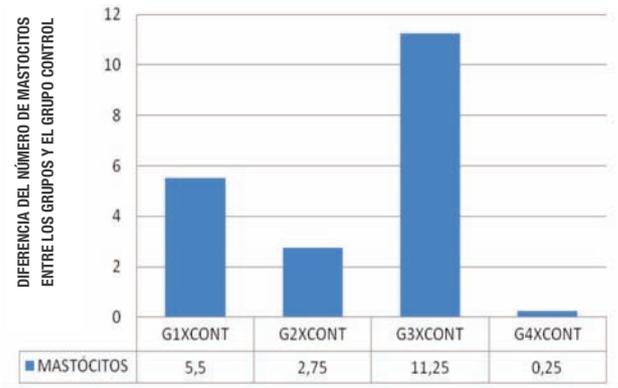
Al correlacionar las medias de fibras elásticas presentes entre los grupos sometidos a fototerapia por LED y el grupo control, hubo resultados significativos ($p < 0,05$) con relación a todos los grupos como muestra la Figura 4b.

Las foto micrografías muestran los cortes histológicos de animales del grupo 2, sometido a Fototerapia por LED de veinte sesiones de diez minutos (Figura 5a). La foto micrografía (Figura 5b) muestra el corte histológico de ratones del grupo 3 sometidos a fototerapia por LED de diez sesiones de veinte minutos. En cuanto que la foto micrografía (Figura 5c) muestra el corte histológico del grupo control.

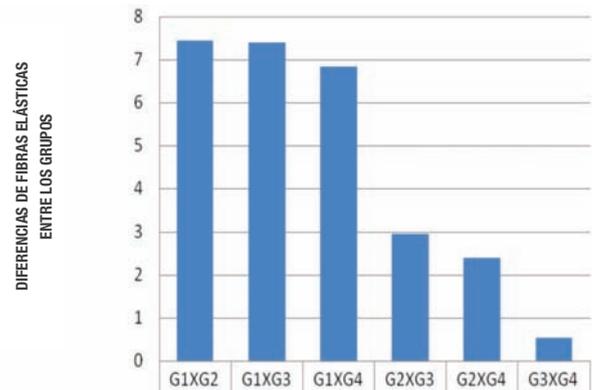
Al evaluar la presencia de fibras elásticas en los grupos estudiados fue observada una concentración más grande en los grupos 1, 2, 3 y 4 en relación al grupo control, con resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$), tal como se muestra en la figura 4b. Se ha observado que cuanto más grande es la cantidad de sesiones, mayor es la cantidad de fibras elásticas, independiente del tiempo de tratamiento. Tal vez el sistema tienda a saturarse por no conseguir un efecto biológico mayor, después de 10 minutos de aplicación.

Discusión

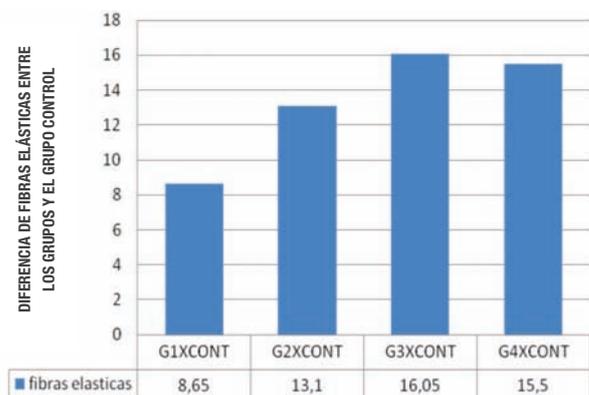
El LED esta siendo muy utilizado para la reducción de los señales de envejecimiento, debido a sus componentes antiinflamatorios en combinación a la acción sobre células reguladoras, ayudando a mejorar los resultados de otros tratamientos dérmicos relacionados con el rejuvenecimiento. Con estos efectos, la fototerapia con LED muestra una posibilidad de ser un abordaje eficaz para el rejuvenecimiento de la piel⁶.

**Figura 3b**

La figura muestra la diferencia entre el número de mastocitos visualizados en cortes histológicos entre los grupos sometidos a la ledterapia y el grupo control.

**Figura 4a**

La figura muestra la diferencia en las medias de fibras elásticas en cortes histológicos entre los grupos.

**Figura 4b**

La figura muestra la diferencia entre el número de fibras elásticas de los cortes histológicos entre los grupos que sufrieron LED terapia y el grupo control.

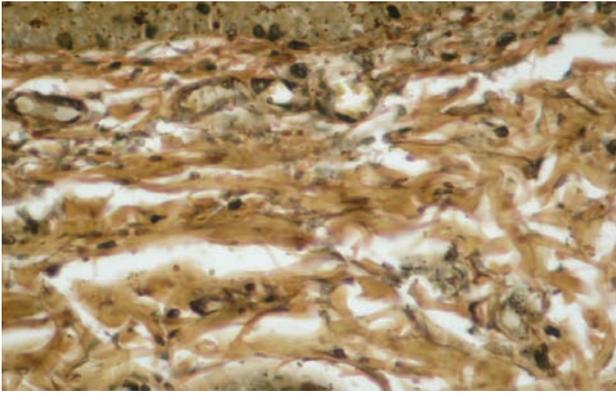


Figura 5a

Fotomicrografía de animal del grupo tratado II (20 sesiones de 10 minutos) mostrando la presencia de fibras elásticas – Verhoeff 400x.

En ese estudio se observó que no existen diferencias significativas entre los grupos tratados y control en cuanto a la cantidad de fibras colágenas. Este resultado es contrario a los expuestos por algunos autores⁷, quienes afirman que la LED terapia promueve un aumento significativo de la cantidad de fibras colágenas. Sin embargo, se vió un aumento en el número de fibras colágenas, a pesar de no diferir significativamente ese resultado en relación al grupo control. Este resultado también difiere de los hallados por otros autores⁸, quienes indican que la fototerapia sea por luz coherente (láser) o no coherente (LED) presentan efecto bioestimuladores en la producción de colágeno en las úlceras de ratas.

Según algunos autores⁹, la bioestimulación se caracteriza por una proliferación más grande de fibroblastos y por la producción de vasos sanguíneos, principalmente de capilares, lo que justifica un proceso de cicatrización elevado y una mayor cantidad de fibras colágenas.

El LED rojo tiene una longitud de onda de 630-780nm, y ha sido empleado en la prevención del envejecimiento y cicatrización de heridas. Varios estudios han investigado la luz roja y sus efectos primarios durante la fase de proliferación, en el proceso de cicatrización de heridas, destacando la estimulación de los fibroblastos, una mayor síntesis del colágeno joven y maduro, mayor producción de factores de crecimiento, incluyendo factor básico del crecimiento del colágeno (bFGF), estimulación del factor de crecimiento (TGF), macrófagos, linfocitos y la estimulación de una tasa más grande de producción de matriz extracelular; todos estos han sido relatados con tratamientos de LED rojo^{9, 10}.

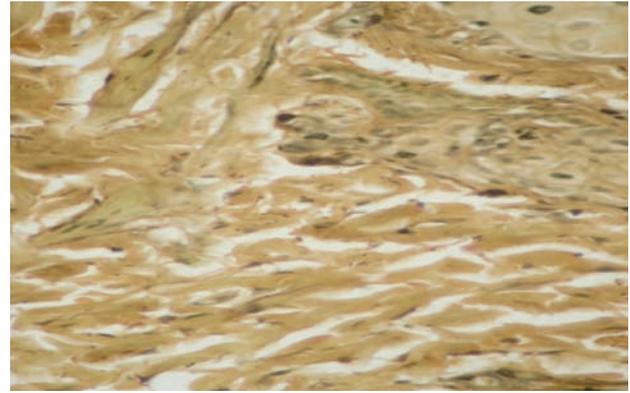


Figura 5b

Fotomicrografía de animal del grupo tratado III (10 sesiones de 20 minutos) mostrando la presencia de fibras elásticas – Verhoeff 400x.

En este estudio se observó un aumento en la formación de neo-vasos en todos los grupos tratados en relación al grupo control, resultado que concuerda con algunos autores⁶, que afirman que la LED terapia favorece el proceso de angiogénesis. De acuerdo con otros autores¹⁰, ese resultado se torna importante por el efecto que tiene el proceso de formación de neo-vasos, papel fundamental en los procesos de cicatrización, en los cuales, nuevos vasos surgen a partir de otros ya existentes y que favorece la recuperación de la estructura del tejido normal. Se observó que la formación de neo-vasos no depende directamente del número de sesiones, pero varía de acuerdo con los tiempos de aplicación del LED.

En la investigación, se notó que la aplicación del LED no promovió la producción significativa de células inflamatorias como los mastocitos, comparado al grupo control. Para algunos autores¹¹, en los procesos inflamatorios, el depósito de colágeno por los fibroblastos es estimulado por los mastocitos lo que no concuerda con otros trabajos científicos.

Básicamente las investigaciones hablan sobre los fibroblastos, pero también existen otros posibles efectos fisiológicos relacionados a una cicatrización y que también son observados, como la represión y alteraciones de los procesos inmunes indeseables, el aumento de las actividades de los leucocitos, neovascularización, aumento de la producción de factores de crecimiento y enzimas¹².

En la evaluación de la cantidad de fibras elásticas, se observó que en todos los grupos tratados existió una elevada producción de fibras elásticas, de manera significativa. Las fibras elás-

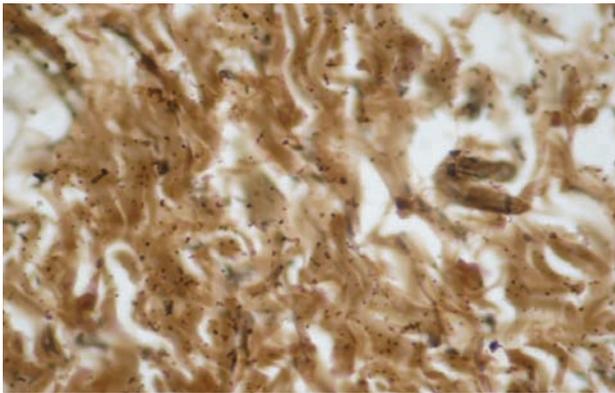


Figura 5c

Fotomicrografía de animal del grupo control mostrando la presencia de fibras elásticas – Vehoeff 400x.

Las fibras elásticas son un importante componente del tejido conectivo, es ella quien otorga resistencia y elasticidad a la piel. Las fibras elásticas son fundamentales para mantener la integridad de la piel¹³.

Este resultado concuerda con la literatura¹⁴, como muestra el análisis histológico, después de su utilización se experimentó un aumento significativo en la cantidad del colágeno y fibras elásticas. Estructuralmente los exámenes demostraron que los fibroblastos fueron altamente activados, rodeados por abundantes fibras elásticas y colágenas, factor que puede verificarse en el análisis de las láminas, junto con el conteo de las fibras elásticas.

Se sugieren más estudios que confirmen estos hallazgos y que puedan mostrar estos resultados en el tratamiento clínico de pacientes con envejecimiento facial. Las limitaciones para el desarrollo de este estudio están relacionadas a la dificultad para el análisis de las posibles alteraciones en las fibras colágenas con la metodología adoptada, sugiriendo la utilización de equipamientos de análisis más avanzados para mejorar la visualización del tejido conjuntivo.

Conclusión

Por lo tanto, se infiere que la LED terapia promueve la reorganización y estimulación del tejido conjuntivo de la dermis, favoreciendo la producción de un tejido más elástico, firme y eficiente, teniendo efectos positivos sobre la reducción de las señales características del proceso de envejecimiento, tales como el decaimiento de la piel, flacidez, pérdida de elasticidad y formación de arrugas.

Referencias bibliográficas

1. Suehara L Y, Simone K, Maia M. Avaliação do envelhecimento facial ao tabagismo. *An Bras Dermatol*. 2006;81:34-39.
2. Hedelund L, Due E, Bjerring P, Wulf HC, et al. Skin Rejuvenation Using Intense Pulsed Light. *Arch Dermatol*. 2006;142(8):985-989.
3. Gilaberte Y, Serra-Guillén C, de las Heras ME, Ruiz-Rodríguez R, Fernández-Lorente M, Benvenuto-Andrade C, et al. Photodynamic therapy in dermatology. *Actas Dermosifiliogr*. 2006;97(2):83-102.
4. Teider LD, et al. Eficiência de dois sistemas de Luz: Halógena x Leds, Publ. UEPG Ci.Biol.Saúde, Ponta Grossa, 2005;11:73-78.
5. Tatum BIS, Fernandes ICAG. Avaliação dos Efeitos de LEDs na cicatrização de feridas cutâneas em ratos wistar [Trabalho de Conclusão de Curso]. Natal: Universidade Potiguar, Curso de Fisioterapia; 2008.
6. Meyer PF, Canela PMS, Ronzio O A, Carvalho MGF, SILVA RMV, et al. Led's effects in wistar's rats wound healing. In: 16 th International WCPT Congress 20-23 June, 2011, Amsterdam. *Physiotherapy*, Amsterdam: Elsevier, 2011. v. 97.
7. Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(2):102-106.
8. Leite NS. Fototerapia como estímulo à cicatrização de úlceras dorsais em ratos nutridos e desnutridos [Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia; 2008.
9. DeLand MM, Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG. Treatment of radiation-induced dermatitis with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Lasers Surg Med*. 2007; 39(2):164-168.
10. Al-Watban FA, Andres BL. Polychromatic LED Therapy in Burn Healing of Non-diabetic and Diabetic Rats. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 2003; 21(5): 249-258.
11. Oliveira MQ, Sudgursky MA. Biocompatibilidade das matérias pode ser avaliada através dos Mastócitos. *R.Ci. Méd.biol*. 2008;17(1):31-39.
12. Dall Agnol MA, Nicolau RA, 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 Med Sci*. 2009;24(6):909-916.
13. Vinck EM, Cargnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(2):167-171.
14. Lee SY, Park KH, Choi JW, Kwon JK, Lee DR, et al. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blinded, and split-face clinical study on LED phototherapy for skin rejuvenation: Clinical, profilometric, histologic, ultrastructural, and biochemical evaluations and comparison of three different treatment settings. *J Photochem Photobiol B*. 2007;88(1):51-67.