

Artigo original

Efeito da laserterapia de baixa potência sobre a proliferação de mioblastos C2C12

Effect of low-energy laser irradiation on the proliferation of C2C12 myoblasts

Tatiana Dias da Silva*, Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, D.Sc.***, Nadhia Helena Costa Souza***, Camila Aparecida Alves Silva***, Manoela Domingues Martins, D.Sc.***, Sandra Kallil Bussadori, D.Sc.***, Kristianne Porta Santos Fernandes, D.Sc.**

.....
*Aluna do Curso de Mestrado, Departamento de Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, São Paulo/SP, **Profª Dra do Curso de Mestrado, Departamento de Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, ***Aluna do Curso de Fisioterapia, Universidade Nove de Julho

Resumo

Os efeitos da laserterapia de baixa potência estão diretamente relacionados aos parâmetros dosimétricos e ao tipo de laser utilizado. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes doses de irradiação dos lasers de GaAlAs e de InGaAlP sobre a proliferação de mioblastos cultivados em situação de carência nutricional (modelo de mimetização de injúria muscular). Os mioblastos C2C12 cultivados em meio deficiente em nutrientes foram irradiados com laser de baixa potência de GaAlAs (660 nm) e InGaAlP (780 nm) com densidades de energia de 1,3, 2,5, 3,8 e 5 J/cm² e 1,3, 2,5, 5 e 6,3 J/cm², respectivamente. A proliferação celular foi avaliada 48 horas após a irradiação por meio da mensuração da atividade mitocondrial e do ensaio de cristal violeta. Não houve diferença significativa na proliferação celular entre as culturas irradiadas e culturas de controle para qualquer um dos parâmetros. Mais estudos são necessários para determinar os parâmetros ideais da laserterapia na bioestimulação de mioblastos.

Palavras-chave: mioblastos, laser, proliferação celular.

Introdução

As lesões musculares são muito comuns nas práticas esportivas, sendo as principais responsáveis pelos afastamentos dos atletas durante competições ou treinamentos [1-2].

Nestas situações de injúria muscular, o processo de formação do novo tecido requer que células mononucleadas quiescentes precursoras se tornem ativas, se proliferem, se dife-

Abstract

The effects of phototherapy using low-level laser depend on irradiation parameters and the type of laser used. The aim of the present study was to evaluate the effect of phototherapy on the proliferation of C2C12 myoblasts in cell culture under deficient nutritional condition (muscle injury model) using low-level GaAlAs and InGaAlP lasers. C2C12 myoblasts in nutrient-deficient medium were irradiated with low-level GaAlAs (660 nm) and InGaAlP (780 nm) lasers with energy densities of 1.3, 2.5, 3.8 e 5 J/cm², and 1.3, 2.5, 5 e 6.3 J/cm², respectively. Cell proliferation was assessed 48 hours after irradiation by measuring the mitochondrial activity and by the crystal violet assay. There were no significant differences in cell proliferation between laser-treated myoblasts and control cultures for any of the parameters. Further studies are necessary to determine the correct laser parameters for the biostimulation of myoblasts.

Key-words: myoblasts, laser, cell proliferation.

renciem em mioblastos e se fundam para formar os miotubos. Subsequentemente, os miotubos irão sofrer diferenciação e maturação para formar fibras musculares funcionais reparando assim as miofibrilas danificadas [3-8].

Um dos recursos bioestimulantes mais utilizados com o intuito de acelerar o processo de reparo do tecido muscular esquelético é a terapia com laser de baixa potência (LBP). Em contrapartida ainda são escassas, e por vezes contraditórias, as

Recebido em 13 de dezembro de 2009; aceito em 12 de abril de 2010.

Endereço para correspondência: Kristianne Porta Santos Fernandes, Av. Francisco Matarazzo, 612, 5001-1000 São Paulo SP, Tel: (11) 3665-9325, E-mail: kristianneporta@gmail.com

evidências científicas e clínicas que determinam os parâmetros dosimétricos e metodológicos necessários à aquisição de seus objetivos terapêuticos [1,9-13].

Por outro lado, a avaliação dos efeitos do laser em cultura celular permite padronizar as amostras, estabelecer rígido controle sobre o pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de gás carbônico e de oxigênio, possibilitando uma compreensão mais aprofundada e específica sobre o efeito terapêutico deste recurso [14-15]. É possível ainda mimetizar a injúria muscular em cultura celular [16], por meio da diminuição da concentração de nutrientes no meio de cultivo, pois após uma lesão muscular a região sofre isquemia, há falta de nutrientes e de oxigênio [17].

Além disso, o uso de linhagens celulares elimina a possibilidade da influência da irradiação laser sobre a produção de fatores ativos por células não miogênicas contidas em culturas primárias, como fibroblastos e macrófagos [7,9,18-19].

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos lasers de Arseneto de Gálio Alumínio (GaAlAs, 660nm) e de Fosfeto Índio Gálio Alumínio (InGaAlP, 780 nm) sobre a proliferação de mioblastos (linhagem C2C12) cultivados em situação de mimetização de injúria muscular.

Material e métodos

Cultura celular

A linhagem celular C2C12 é um subclone da linhagem celular de mioblastos C2 derivada de células satélites de ratos adultos [20,21]. As células C2C12 foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Cultilab), sempre a 37°C em um ambiente úmido e a 5% CO₂. As células foram mantidas em estado de subconfluência e repicadas a cada 2 ou 3 dias.

Experimentos

Antes dos experimentos, todas as culturas foram examinadas e a sua viabilidade foi confirmada pelo método de exclusão do azul de trypan. Para induzir o estresse celular, metade das culturas foi cultivada em DMEM suplementado com apenas 5% de SFB por 24 hs antes de cada experimento. Esta situação *in vitro* produz estresse similar às condições de estresse *in vivo*, reduzindo as taxas de crescimento celular [15,21-25] e, portanto, permitindo a observação dos possíveis efeitos da fototerapia no crescimento das culturas [15,22].

Irradiação laser

As células foram irradiadas com os lasers de GaAlAs (660nm) e de InGaAlP (780 nm) (MMOptics Ltd., São Carlos, SP, Brasil) nos parâmetros listados na tabela I, sendo

o tempo de exposição fixado em 10 segundos. A potência de saída dos lasers foi checada por meio de um medidor de potência LaserCheck (Coherent, Santa Clara, CA, USA). Para padronizar os resultados, a distância entre o cabeçote do laser e as culturas celulares foi mantida constante. A irradiação foi aplicada no fundo dos tubos de ensaio que continham as células em cultura, como anteriormente descrito [16]. Desta maneira, o feixe laser não passou pelo meio de cultura, mas foi aplicado diretamente no agregado celular presente no fundo dos tubos. As culturas controle foram submetidas às mesmas condições experimentais que as células dos grupos experimentais, exceto para a irradiação. As irradiações foram realizadas em penumbra para evitar a influência de outras fontes de luz.

Tabela I - Parâmetros dosimétricos utilizados.

Comprimento de onda	Potência de saída (mW)	Área cabeçote (cm ²)	Potência (mW/cm ²)	Densidade de energia (J/cm ²)
780	5	0.4	12.5	1.3
780	10	0.4	25	2.5
780	20	0.4	50	5
780	25	0.4	62.5	6.3
660	5	0.4	12.5	1.3
660	10	0.4	25	2.5
660	15	0.4	37.5	3.8
660	20	0.4	50	5

Os grupos experimentais incluíram o grupo controle (não irradiado), os grupos tratados com laser de 780 nm operando a 1,3, 2,5, 5 e 6,3 J/cm², e os grupos tratados com o laser de 660 nm operando a 1,3, 2,5, 3,8 e 5 J/cm². Todos os grupos foram cultivados em meio de cultura contendo 5% SFB.

Efeitos da irradiação laser sobre a proliferação celular

Depois da irradiação, as culturas do grupo controle e as experimentais foram distribuídas (10⁴ células/poço) em placas de 96 poços. Para a análise de proliferação celular, as células foram incubadas em um ambiente úmido com 5% de CO₂ por 48 horas. A análise da atividade mitocondrial e o ensaio de cristal violeta foram, então, realizados para avaliar a proliferação celular.

Análise da atividade mitocondrial (teste MTT)

A função mitocondrial dos mioblastos C2C12 foi avaliada por meio do ensaio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Depois da irradiação laser e incubação por 48 horas, o MMT foi adicionado às culturas celulares numa concentração de 0,5 mg/mL e as células foram in-

cubadas num ambiente úmido, contendo 5% CO₂, a 37° por 3 h. Depois deste período, 100 mL de isopropanol foi adicionado em cada poço para dissolver os cristais formazan. A absorbância foi medida a 620 nm usando um leitor de microplacas (Anthos2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria).

Ensaio de cristal violeta

O ensaio cristal violeta é útil para obter informação quantitativa sobre a densidade relativa de células aderidas em placas de cultura. Brevemente, ao final do período de incubação, e depois da remoção do meio de cultura, as placas de 96 poços foram lavadas com 100 ml de PBS por poço, coradas por meio da adição de 10 µl de solução cristal violeta a 0.5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em 30% de ácido acético, por 15 minutos em temperatura ambiente e finalmente lavadas com água destilada [16]. O cristal violeta foi solubilizado em 200 µl de etanol por 30 minutos e a absorbância foi medida a 620 nm usando o leitor de microplacas.

Análise estatística

Os dados de absorbância (correspondente à proliferação celular) foram obtidos em quadruplicata e estão representados como médias ± valores de desvio padrão (DV). As comparações entre os grupos foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) e o teste Dunnett foi usado para determinar diferenças significativas entre os grupos irradiados e o grupo controle. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram analisados usando o software estatístico GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Foram realizados 3 experimentos independentes em quadruplicata embora apenas um único experimento representativo dos três realizados está demonstrado em cada figura.

Resultados

Efeito da irradiação de laser InGaAlP na proliferação celular (780 nm a 1,3, 2,5, 5 e 6,3 J/cm²)

Não houve diferença significativa na proliferação celular (avaliada pelos métodos MTT e cristal violeta) entre mioblastos tratados com laser e culturas controle depois de 48 horas de incubação.

A Figura 1 (A e B) mostra a comparação entre a proliferação dos mioblastos C2C12 irradiados com o laser 780 nm (com densidades de energia 1,3, 2,5, 5 e 6,3 J/cm²) com a proliferação das culturas controle não irradiadas, ambas cultivadas em meio com 5% de SFB (modelo de mimetização de injúria muscular).

Figura 1A - Viabilidade e proliferação celular medida como absorbância (ensaio cristal violeta) de células C2C12 em meio de cultura (5% SFB) e irradiadas com o laser de diodo AsGaAl (780 nm) com densidades de energia de 1,3, 2,5, 5 e 6,3 J/cm². Não houve diferença significativa na viabilidade celular entre os grupos de controle e experimental em ambos os ensaios.

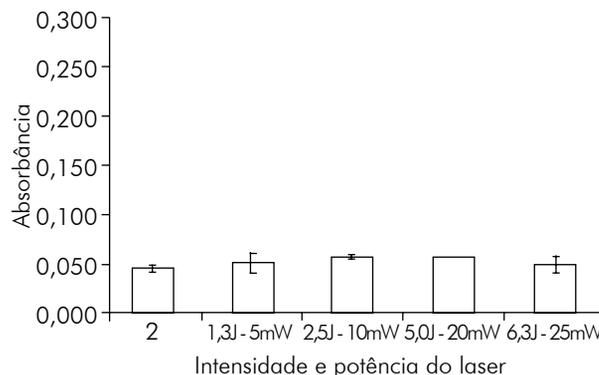
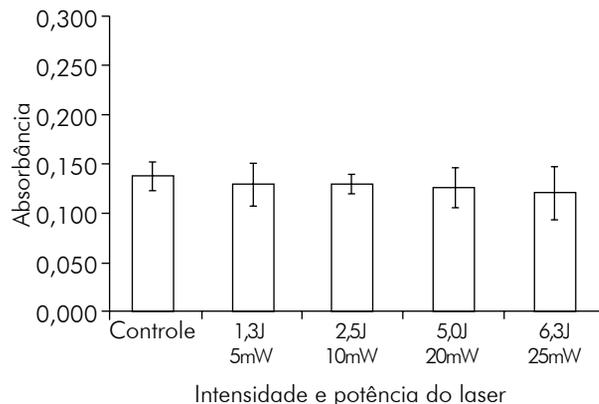


Figura 1B - Viabilidade e proliferação celular medida como absorbância (ensaio MTT) de células C2C12 em meio de cultura (5% SFB) e irradiadas com o laser de AsGaAl (780 nm) com densidades de energia de 1,3, 2,5, 5 e 6,3 J/cm². Não houve diferença significativa na viabilidade celular entre os grupos de controle e experimental em ambos os ensaios.



Efeito de irradiação do laser de GaAlAs na viabilidade celular (660 nm a 1,3, 2,5, 3,8 e 5 J/cm²)

Da mesma forma, nos grupos tratados com o laser de 660 nm, não houve diferença significativa na proliferação celular (avaliada pelo método MTT e pelo ensaio de cristal violeta) entre mioblastos tratados com laser e células controle, depois de 48 horas de incubação.

A Figura 2 (A e B) mostra a comparação entre a proliferação dos mioblastos C2C12 irradiados com o laser de 660 nm (com densidades de energia de 1,3, 2,5, 3,8 e 5 J/cm²) com a proliferação das culturas controle não irradiadas, ambas cultivadas em meio de cultura (5% de SFB).

Figura 2A - Viabilidade e proliferação celular medida como absorbância (ensaio cristal violeta) de células C2C12 em meio de cultura (5% SFB) e irradiadas com o laser de diodo GaAlAs (660 nm) com densidades de energia de 1,3, 2,5, 3,8 e 5 J/cm². Não houve diferença significativa na viabilidade celular entre os grupos de controle e experimental em ambos os ensaios.

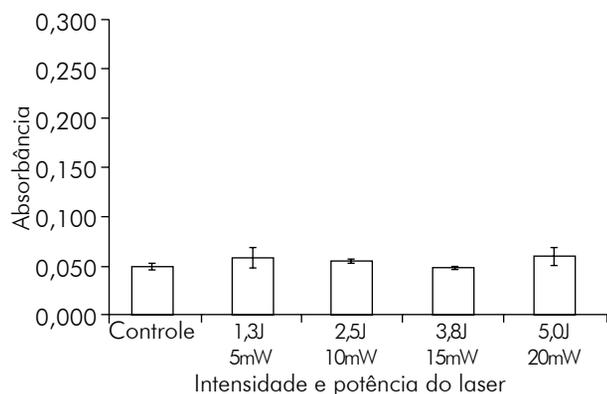
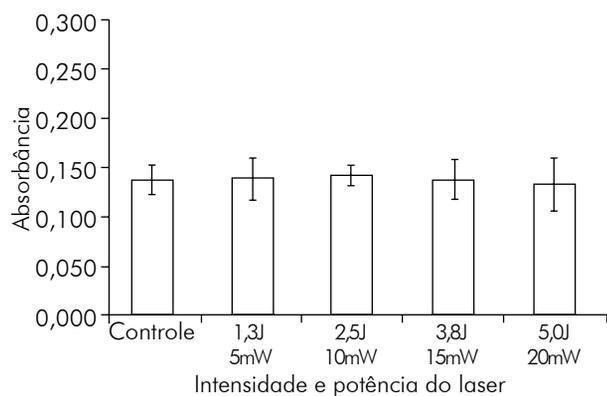


Figura 2B - Viabilidade e proliferação celular medida como absorbância (ensaio MTT) de células C2C12 em meio de cultura (5% SFB) e irradiadas com o laser de diodo GaAlAs (660 nm) com densidades de energia de 1,3, 2,5, 3,8 e 5 J/cm². Não houve diferença significativa na viabilidade celular entre os grupos de controle e experimental em ambos os ensaios.



Discussão

O presente estudo demonstrou que a laserterapia em diferentes comprimentos de onda e parâmetros de energia não foi capaz de prover taxas de crescimento mais altas que as obtidas nas culturas dos grupos controle. Estes resultados foram confirmados por dois diferentes ensaios de viabilidade celular: o ensaio cristal violeta, que indica a densidade relativa das células aderidas à placa e o ensaio MTT, que avalia a atividade mitocondrial.

Os relatos científicos sobre a aplicação destes lasers (nestes mesmos comprimentos de onda) em culturas celulares demonstram resultados variáveis. São relatados efeitos diferentes, mesmo usando parâmetros similares, dependendo do tipo tecidual e celular e da função avaliada [9,16,22-29].

De fato, cada tipo celular ou linhagem tem um pico ótimo de irradiação que é dose-dependente, podendo-se estabelecer inclusive uma curva de fluência versus resposta biológica, de modo que valores acima deste pico ocasionam uma fotoinibição, conforme o conceito da lei de Arndt-Schultz [30-33].

Optamos aqui pela utilização da linhagem celular C2C12 pelo fato destas células derivarem de músculo esquelético de camundongos, exibirem a maioria das características dos mioblastos normais e diferenciarem-se em cultura, propiciando um bom modelo para estudar a regeneração muscular [7,9,19,34].

Foram investigados os efeitos da irradiação do laser de GaAlAs sobre a função mitocondrial de miotubos C2C12 para determinar os parâmetros de irradiação que poderiam ser utilizados para melhorar a função das mitocôndrias. Neste estudo, as culturas de miotubos foram continuamente irradiadas, por 600 s, com um laser de 810 nm em densidades de energia de 0,33-14,16 J/cm². Os autores [35] relataram que densidades de energia de 0,33-8,22 J/cm² não causam nenhum dano para a função mitocondrial das células, enquanto que doses de 11,22-14,16 J/cm² são deletérias à função celular.

Os resultados de nosso estudo não puderam ser comparados com os relatados por Xu *et al.* [35], pois utilizaram um comprimento de onda diferente (810nm) e relataram apenas as densidades de energia e tempo de irradiação. Além disso, eles induziram a diferenciação dos mioblastos C2C12, avaliando os efeitos do laser sobre miotubos.

Nosso grupo avaliou os efeitos dos lasers de GaAlAs (660 nm) e de InGaAlP (780 nm) sobre a viabilidade de mioblastos C2C12 utilizando dosagens de 3,8, 6,3 e 10 J/cm², e 3,8, 10 e 17,5 J/cm², respectivamente. Nestes parâmetros a irradiação laser não altera a viabilidade celular após período de incubação de 24 horas de aplicação [16]. Também foi demonstrado que os mioblastos C2C12 cultivados em meio, com apenas 5% de Soro Fetal Bovino (SFB), conservam sua viabilidade, mas as taxas de crescimento caem significativamente quando comparadas às células cultivadas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Portanto, a concentração de soro proposta neste trabalho é apropriada para o experimento, pois mimetiza a lesão muscular sem comprometer a viabilidade das células [16].

Diante da variabilidade encontrada na literatura quanto aos efeitos da aplicação destes lasers, sabemos que ainda existe um vasto campo de pesquisa a ser explorado a fim de que seja possível estabelecer parâmetros ideais de aplicação para mioblastos e finalmente, para a obtenção dos efeitos terapêuticos desejados com a laserterapia.

Conclusão

No presente estudo, os parâmetros avaliados também não foram suficientes para a bioestimulação dos mioblastos, assim, outros estudos são necessários para entender os mecanismos de bioestimulação a laser em células de músculo esquelético. Além disso, tais estudos também podem determinar os parâmetros de laser corretos para otimizar a bioestimulação de mioblastos.

Referências

- Ferrari RJ, Picchi LD, Botelho AP, Minamoto V. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. *Fisioter Mov* 2005;18(2):63-71.
- Jarvinen TAH, Kaariainen M, Jarvinen M, Kalimo H. Muscle strain injuries. *Curr Op Rheumatol* 2000;12:155-61.
- Bischoff R, Heintz C. Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev Dyn* 1994;201(1):41-54.
- Sakuma K, Nishikawa J, Nakao R, Watanabe K, Totsuka T, Nakano H et al. Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2. *Acta Neuropathol Berl* 2003;105:271-80.
- Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem* 2002;50:589-610.
- Dominov JA, Dunn JJ, Miller JB. Bcl-2 expression identifies an early stage of myogenesis and promotes clonal expansion of muscle cells. *Cell Biol* 1998;142:537-44.
- Kumar A, Mohan S, Newton J, Rehage M, Tran K, Baylink DJ. Pregnancy-associated plasma protein-A regulates myoblast proliferation and differentiation through an insulin-like growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2005;280 (45):37782-89.
- Dogra C, Hall SL, Wedhas N, Linkhart TA, Kumar A. Fibroblast growth factor inducible-14 (Fn14) is required for the expression of myogenic regulatory factors and differentiation of myoblasts into myotubes: evidence for Tweak-independent functions of Fn14 during myogenesis. *J Biol Chem* 2007;282:1-16.
- Amaral AC. Influência da terapia laser de baixa intensidade em células precursoras miogênicas (in vitro) e durante a regeneração muscular (in vivo) [Tese]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2004.
- Weiss N, Oron U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anat Embryol* 1992;186:497-503.
- Bibikova A, Oron U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. *Anal Rec* 1993;235:374-80.
- Oliveira NML, Parizzoto NA, Salvini TF. GaAs (904-Nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers Surg Med* 1999;25:13-21.
- Lopes-Martins RAB, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti Jr AC, Muscará MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol* 2006;101:283-8.
- Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5ª ed. New York: John Wiley; 2005.
- Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zzell DM, Schubert MM, Eduardo CP, et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med* 2007;39(4):365-72.
- Ferreira MP, Ferrari RA, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DA, et al. Effect of low-energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium gallium indium phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg* 2009;27(6):901-6.
- Shefer G, Barash I, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochim Biophys Acta* 2003;1593:131-9.
- Lee MH, Jang MH, Kim EK, Han SW, Cho SY, Kim CJ. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *J Pharmacol Sci* 2005;97:369-76.
- Amack JD, Mahadevan MS. The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum Mol Gen* 2001;10(18):1879-87.
- Yaffe D, Saxel D. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 1977;270:725-7.
- Yoshiko Y, Hirao K, Maeda, N. Differentiation in C2C12 myoblasts depends on the expression of endogenous IGFs and not serum depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C1278-86.
- Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 2001;29(2):179-84.
- Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002;31(4):263-7.
- Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblasts growth. A pilot study. *Lasers Med Sci* 2006;21(2):86-9.
- Fujihara NA. Estudo da adesão, proliferação e síntese de proteínas por osteoblastos cultivados e submetidos à ação do laser de baixa potência [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo; 2002.
- Marques MM, Pereira NA, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2004;34(3):260-5.
- Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med* 2005;36:8-12.
- Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med* 2006;38(4):332-6.
- Kreisler M, Christoffers AB, Willerstaussen 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;30:353-8.
- Baxter GD. Therapeutic lasers: theory and practice. United States of America: Churchill Livingstone; 1997.
- Low L, Reed A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. 3ª ed. Barueri: Manole; 2001.
- Tiphlova OA, Karu TI. Action of monochromatic low-intensity visible light on growth of E.coli. *Microbiol* 1987;60:626-30.
- Meneguzzo DT. Influência do fracionamento da energia de irradiação na fototerapia com laser de baixa intensidade sobre o crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.
- Kirkendall DT, Garrett WEJ. Clinical perspectives regarding eccentric muscle injury. *Clin Orthop Relat Res* 2002;403(Suppl 1):S81-89.
- Xu X, Zhao X, Cheng-Yi Liu T, Pan H. Low-intensity laser irradiation improves the mitochondrial dysfunction of C2C12 induced by electrical stimulation. *Photomed Laser Surg* 2008;26:197-202.