

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

RENAN DIDIER DE PAULA LOVISETTO

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO UTILIZANDO DIFERENTES FONTES
DE LUZ E PARÂMETROS DOSIMÉTRICOS SOBRE A DIFERENCIAÇÃO E
MIGRAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS MUSCULARES**

São Paulo, SP

2019

RENAN DIDIER DE PAULA LOVISETTO

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO UTILIZANDO DIFERENTES FONTES
DE LUS E PARÂMETROS DOSIMÉTRICOS SOBRE A DIFERENCIAÇÃO E
MIGRAÇÃO DE CÉLULAS PRECURSORAS MUSCULARES**

Dissertação apresentada à
Universidade Nove de Julho
como pré-requisito para a
obtenção do título de mestre
em Ciências da Reabilitação.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

São Paulo, SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Lovisetto, Renan Didier de Paula.

Efeitos da fotobiomodulação utilizando diferentes fontes de luz e parâmetros dosimétricos sobre a diferenciação e migração de células precursoras musculares. / Renan Didier de Paula Lovisetto. 2019. 49 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof. Dr. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari.

1. Mioblastos C2C12. 2. Fotobiomodulação. 3. Migração celular. 4. Diferenciação celular. 5. Laser. 6. LED.

I. Ferrari, Raquel Agnelli Mesquita.

II. Título.

CDU 615.8

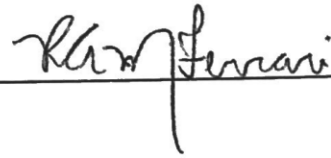
São Paulo, 17 de dezembro de 2019.

TERMO DE APROVAÇÃO

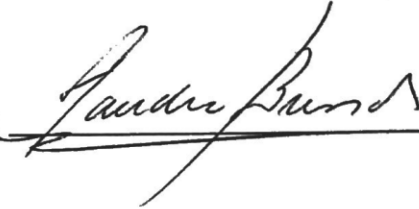
Aluno(a): Renan Didier de Paula Lovisetto

Título da Dissertação: "Efeitos da Fotobiomodulação Utilizando Diferentes Parâmetros Dosimétricos Sobre a Diferenciação e Migração de Células Precursoras Musculares".

Presidente: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROFA. DRA. SANDRA KALIL BUSSADORI



Membro: PROFA. DRA. PATRÍCIA APARECIDA DA ANA



AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais que sempre me ajudaram na realização de todos os meus sonhos.

A minha esposa por me apoiar em todos os momentos de dificuldade e estar sempre ao meu lado.

A minha orientadora **Dr.^a Raquel Agnelli Mesquita Ferrari** por toda a sua dedicação, paciência, suporte, correções e incentivos, muito obrigado e saiba que te admiro muito.

A **Tainá Caroline dos Santos**, por me guiar durante todo o trabalho nos laboratórios e principalmente por me mostrar um ambiente totalmente novo pelo qual me apaixonei.

Ao **Lucas Andreo, Agnelo Alves, e Kaline Souza** por me ajudarem e serem muito prestativos nos laboratórios.

Ao **Marcelo Alves**, por toda a sua empatia comigo durante essa jornada.

A prof^a **Sandra Kalil Bussadori** que me acolheu e me orientou com toda a sua simpatia.

Ao prof. **Rodrigo Labat**, que esteve muito presente e solícito durante o módulo internacional.

Aos alunos de iniciação científica, **Laiane, Diana e Gabriel**, que estiveram presente durante o trabalho e saibam que admiro muito a curiosidade e vontade de aprender de vocês.

Às técnicas de laboratório **Haryanne e Nubia** sempre presentes e muito prestativas

E também a todos os funcionários da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) por proporcionarem um ambiente propício para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O tecido muscular esquelético apresenta alta capacidade de regeneração após lesões devido à presença de células satélites (CS) musculares. A fotobiomodulação (FBM) possui efeitos positivos durante o processo de reparo muscular em estudos experimentais e clínicos. O objetivo desse estudo foi avaliar de forma comparativa os efeitos da FBM utilizando o laser em baixa potência (LBP) e o diodo emissor de luz (LED) como fontes de luz em diferentes parâmetros dosimétricos sobre a fusão e migração de mioblastos C2C12. Os mioblastos C2C12 foram cultivados em meio de proliferação (DMEM + 10%SFB) e analisados em diferentes grupos experimentais: (a) controle LBP; (b) LBP 40 mW; (c) LBP 70 mW; (d) controle LED; (e) LED 40 mW; (f) LED 70 mW. As células dos grupos experimentais (b) e (c) foram expostas a uma única irradiação usando um LBP infravermelho (AsGaAl). As células dos grupos (e) e (f) foram irradiadas com o LED infravermelho. Após a irradiação as células foram plaqueadas e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 24, 48 e 72h para avaliação da diferenciação celular pelo índice de fusão e avaliação da migração celular após 6, 12 e 24h de incubação. Os resultados mostraram que as células C2C12 do grupo LBP nas potências de 40 mW e 70 mW apresentaram um índice de fusão aumentado em relação ao grupo controle após 24 h (40 mW - $p < 0,01$; 70 mW - $p < 0,001$) e 72 h (40 mW - $p < 0,05$; 70 mW - $p < 0,01$) e nos grupos LED, apenas 70 mW após 72h apresentou um índice de fusão mais elevado do que o controle ($p < 0,05$). Os resultados também mostraram maior migração celular no grupo LBP utilizando 70 mW em comparação com o grupo controle após 6h ($p < 0,05$) e 24 h ($p < 0,01$) e no grupo LED com 70 mW apenas após 24h ($p < 0,05$). Em conclusão, a FBM utilizada em diferentes fontes de luz e parâmetros dosimétricos foi capaz de aumentar a diferenciação dos mioblastos C2C12 verificada pelo índice de fusão, mas apenas a FBM com 70mW foi capaz de induzir um aumento da migração celular.

Palavras-chave: Mioblastos C2C12; Fotobiomodulação; Migração celular; Diferenciação celular; Laser; LED.

ABSTRACT

The skeletal muscle tissue shown a high regeneration capacity after injury due the presence of muscular satellite cells (SC). Photobiomodulation (PBM) has demonstrated positive effects during muscle repair process in experimental and clinical studies. The aim of this study was to evaluate the effects of PBM using low-level laser and light emitting diode as light sources and different dosimetric parameters in the differentiation and migration of C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts were cultured in proliferation medium and were analyzed in different groups: (a) LLL control; (b) LLL 40mW; (c) LLL 70mW; (d) LED control; (e) LED 40 mW; (f) LED 70 mW. Cells from groups (b) and (c) were exposed to a single irradiation using an infrared LLL (AsGaAl). Cells from groups (e) and (f) were irradiated with the infrared LED. After irradiation all experimental groups were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24, 48 and 72h to evaluated cell differentiation through the fusion index and cell migration using a scratch assay after 6, 12 and 24h of incubation. The results showed that PBM treated C2C12 cells of the 40 mW and 70 mW groups showed an increased fusion index in comparison to the control group after 24 h (40 mW – p <0,01; 70 mW – p <0,001) and 72 h (40 mW – p <0.05; 70 mW – p <0.01), and in the LED experimental groups after 72h only 70 mW had an increased fusion index in comparison to the control group (p<0,05). The results also showed higher cell migration in the PBM treated group using 70 mW in comparison to the control group after 6h (p<0,05) and 24h (p<0.01) and in the 70 mW LED group only after 24h (<0,05). In conclusion, PBM used in different light sources and dosimetric parameters was able to modulate the differentiation of the C2C12 myoblasts verified by the fusion index, but only PBM 70mW was able to modulate their migration.

Keywords: Myoblasts C2C12; Photobiomodulation; Cell migration; Cell differentiation; Laser; LED.

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	9
1.1 Músculo esquelético: estrutura e capacidade de reparo	9
1.2 Fotobiomodulação e reparo muscular	10
2. OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3. METODOLOGIA	16
3.1 Delineamento do estudo	16
3.2 Cultura celular	16
3.3 Grupos experimentais	16
3.4 Procedimento de irradiação	17
3.5 Coloração May-Grunwald e Giemsa	19
3.5.1 Cálculo do índice de fusão	20
3.6 Migração celular	20
3.7 Fluxograma experimental	22
3.8 Análise estatística	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Artigo 1 (Em processo de submissão para revista Photochemistry and Photobiology)	23
5. DISCUSSÃO	39
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
8. APÊNDICE	49
A. Comprovante de publicação como co-autor de estudo utilizando a FBM	49

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Medidas para calcular a distância em pixels.....	21
Fig. 2. Fluxograma dos grupos experimentais.....	22
Fig. 3. Mioblastos C2C12 corados após aplicação do LBP.....	32
Fig. 4. Índice de fusão dos mioblastos C2C12 após aplicação do LBP.....	33
Fig. 5. Mioblastos C2C12 corados após aplicação do LED.....	34
Fig. 6. Índice de fusão dos mioblastos C2C12 após aplicação do LED	34
Fig. 7. Fechamento da ferida após aplicação do LBP.....	35
Fig. 8. Área da ferida após aplicação do LBP.....	36
Fig. 9. Fechamento da ferida após aplicação do LED.....	37
Fig. 10. Área da ferida após aplicação do LED.....	38

LISTA DE ABREVIações

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
C	Celsius
C2C12	Linhagem de células musculares derivadas de camundongos
cm ²	Centímetro quadrado
CK	Creatina quinase
CS	Célula satélite
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBM	Fotobiomodulação
J	Joule
J/cm ²	Joules por centímetro Quadrado
KCL	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
LED	Diodo emissor de luz
LBP	Laser em baixa potência
MGG	May-Grunwald e Giemsa
min	Minuto
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mW	Miliwatts
mW/cm ²	Miliwatts por centímetro Quadrado
Na ₂ HPO ₄	Fosfato Dissódico
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nano metros
PBS	Phosphate-buffered saline
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
µl	Microlitro
λ	Comprimento de onda

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Músculo esquelético: estrutura e capacidade de reparo

O músculo esquelético corresponde a aproximadamente 40% da massa do corpo humano, desempenha papéis fundamentais como a geração de força, controle do movimento esquelético e proteção física para outros órgãos uma vez que está localizado anatomicamente imediatamente abaixo da pele⁽¹⁾. Por conta das suas funções, o músculo esquelético representa um dos tecidos mais frequentemente lesionado e a sua capacidade regenerativa é de importância fundamental para o restabelecimento dessas funções de maneira adequada^(1, 2). No entanto, em algumas situações a regeneração muscular é lenta e pode levar a uma recuperação funcional incompleta tendo a cronificação ou formação de tecido fibroso que interfere diretamente em sua funcionalidade⁽³⁾.

O reparo muscular envolve diferentes fases, sendo que inicialmente é caracterizado pela ruptura celular e consequente necrose das fibras musculares, formação do hematoma e recrutamento de células de caráter inflamatório. Em seguida ocorre a fase de reparo que compreende a fagocitose do tecido necrosado, regeneração das fibras musculares e a produção do tecido conjuntivo. Finalmente ocorre a fase de remodelação, que consiste na maturação das fibras musculares regeneradas e a reorganização do tecido conjuntivo que garantem a recuperação da capacidade funcional do músculo⁽³⁾.

A regeneração do músculo esquelético após a lesão é um processo possível graças a presença das células satélites (CS), que são células precursoras musculares responsáveis pela regeneração e reparação muscular no indivíduo adulto que ao serem ativadas entram no ciclo celular em que se diferenciam e se fundem com as fibras musculares pré existentes ou formam novas fibras musculares para repor as lesionadas ^(3, 4).

As CS permanecem na fibra muscular madura em estado quiescente entre a lâmina basal e o sarcolema e são ativadas após a lesão, iniciando um processo de proliferação e sendo denominadas nesta etapa como mioblastos.

Posteriormente, os mioblastos passam pela fase de diferenciação inicial e fusão, se agrupando entre si e resultando na formação de miotubos multinucleados, para então se fundir nas fibras musculares danificadas e até mesmo na formação de novas fibras de forma a promover a regeneração no local⁽³⁻⁹⁾.

A linhagem de mioblastos C2C12 é derivada das CS de camundongo e fornece um modelo celular estabelecido na literatura para o estudo das principais fases envolvidas na miogênese, devido à sua capacidade de proliferação e diferenciação *in vitro* num processo muito semelhante ao que ocorre *in vivo*^(8, 10-13).

1.2 Fotobiomodulação e reparo muscular

Por muito tempo a fotobiomodulação (FBM) foi utilizada como sinônimo de laser em baixa potência (LBP) contudo esta denominação passou a ser mais ampla abrangendo também outras fontes de luz que apresentam efeitos biológicos como é o caso de diodo emissor de luz (LED). Dessa forma o termo FBM assim engloba todas as fontes capazes de modular os tecidos biológicos através de fótons sem gerar alteração na temperatura⁽¹⁴⁾.

A FBM tem como princípio a absorção da luz pelos cromóforos celulares para produzir um efeito fotobioestimulatório no tecido, sendo necessária a combinação da potência óptica do laser, e do seu comprimento de onda, para determinar a profundidade dos fótons. Nos sistemas musculo esquelético e circulatório, existem uma variedade de cromóforos capazes de absorver os fótons, como exemplo a hemoglobina, mioglobina, e o citocromo C oxidase⁽¹⁵⁾. Além da potência e comprimento de onda, outros fatores relacionados à fonte de luz podem alterar a FBM, como o tipo de emissão (pulsado ou contínuo), densidade de energia, tempo de irradiação, dosagem, energia total entregue, técnica de aplicação e intervalo entre as sessões⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

A FBM é considerada um tratamento não invasivo que consiste na aplicação de uma fonte de luz com potência de saída inferior a 500 mW e com o comprimento de onda que varia entre 400 até 1100 nm (janela terapêutica), com a intenção de estimular o reparo tecidual, na redução do processo

inflamatório e na analgesia, promovendo a cicatrização de feridas e prevenindo a necrose e danos teciduais^(5, 7, 11, 15, 19, 20). Outros efeitos também ocorrem com a aplicação da FBM *in vitro*, como aumento da viabilidade celular, aumento da proliferação e migração⁽¹⁴⁾.

Os benefícios terapêuticos do LBP têm sido reportados desde a década de 60 e os estudos com o LED foram reportados apenas a partir da década de 90. Inicialmente o LBP era o único recurso de FBM até que a *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) desenvolveu uma nova geração de LED, e teve o primeiro paciente tratado com essa tecnologia em 1999⁽²¹⁻²³⁾.

Estudos que comparam os efeitos terapêuticos do LED e LBP encontraram resultados que comprovam que ambos são capazes de induzir efeitos favoráveis para diversos processos e condições avaliadas^(23, 24), e em muitos destes estudos os resultados são semelhantes. Considerando estes aspectos e a questão de custo-efetividade, quando os efeitos são semelhantes há a possibilidade do uso do LED especialmente em áreas maiores por meio da utilização de *clusters*, com custo reduzido quando comparado com o LBP⁽²⁵⁾.

Estudos *in vivo* e *in vitro* relatam efeitos positivos da FBM no tratamento do tecido muscular, sendo eles *in vivo* demonstrando a redução da produção de citocinas inflamatórias⁽²⁶⁾, diminuição da mionecrose, aumento no número de vasos sanguíneos, organização nas fibras de colágeno⁽¹⁹⁾, redução do processo inflamatório agudo⁽²⁷⁾. Já em estudos *in vitro* demonstraram aumento do potencial da membrana mitocondrial⁽²⁸⁾, aumento da viabilidade celular⁽²⁹⁾, aumento na ativação da cadeia respiratória da mitocôndria⁽¹⁶⁾ e ainda assim existe muita controvérsia em sua aplicação devido às diversas combinações de parâmetros da FBM.

Os parâmetros da FBM são muitas vezes relatados de forma imprecisa ou brevemente descritos e devido a uma falta de padronização na exposição e descrição dos parâmetros, assim causando dificuldade na reprodutibilidade dos estudos^(20, 30).

Zein et al. (2018) em uma revisão classificando a utilização da FBM em distintos parâmetros dosimétricos sobre diferentes células de cultura primária e linhagens, puderam classifica-las em relação as suas concentrações

mitocondriais, uma vez que células que contenham um número maior de mitocôndrias apresentam melhor resposta à FBM⁽³¹⁾.

Assim os autores verificaram que em estudos com células que contenham uma alta concentração mitocondrial (como é o caso da C2C12) e que a utilizaram da FBM em comprimentos de onda que variam de 660 até 810 nm, com fluência de 0,05 J/cm² até 64 J/cm², enquanto que a variação da irradiância foi de 0,8 mW/cm² até 100 mW/cm² mostraram resultados mais positivos⁽³¹⁾.

Quando analisados os estudos que aplicaram a FBM em mioblastos C2C12 (tabela 1), podemos observar uma variação nos parâmetros dosimétricos utilizados bem como os resultados encontrados.

Tabela 1. Resumo dos estudos, parâmetros e resultados do tratamento *in vitro* que utilizaram a FBM em mioblastos C2C12

Autor	λ (nm)	Potência (mW)	Irradiância (mW/cm ²)	Fluência (J/cm ²)	Objetivo do estudo	Resultados
FERREIRA et al. (2018) ⁽⁷⁾	660	20	-	2	Realizar um perfil de expressão mRNA em mioblastos após LBP	Regula mRNA que controla proliferação e diferenciação de mioblastos ↓ taxa de fechamento de migração celular
ANDREO et al. (2018) ⁽¹⁹⁾	780	40	1000	10	Avaliar os efeitos da inoculação de mioblastos + LBP no músculo após lesão	↑ Vasos sanguíneos maduros, ↓ mionecrose
SILVA et al. (2016) ⁽³²⁾	685 / 830	35/100	-	2 ~ 7	Analisar LBP contra citotoxicidade induzida pelo veneno de bothrops em mioblastos	↓ do ATP extra celular, ↑ intracelular após exposição à veneno e diferenciação da C2C12

FERRARESI et al. * (2015) ⁽²⁸⁾	630 / 850	25 / 50	28	2,5	Analisar potencial de membrana e ATP nos miotubos de C2C12 expostos ao LED	↑ Potencial da membrana mitocondrial e síntese de ATP
MESQUITA-FERRARI et al. (2015) ⁽²⁹⁾	780	10	0,25	5	Avaliar a viabilidade celular, CK e mRNA após LBP	↑ viabilidade celular, ↑ CK, ↑ mRNA
NGUYEN et al. (2013) ⁽¹⁵⁾	808 até 980	3000 (5Hz)	-	22,8	Avaliar a biogênese mitocondrial no tecido muscular após laser	Ativação da biogênese mitocondrial
MONICI et al. (2013) ⁽³³⁾	808 / 905	550 25000 (20 Khz)	-	-	Possíveis benefícios para combater déficits do metabolismo da energia muscular após laser	↓ Na proliferação celular. Rearranjo citoesquelético
MESQUITA-FERRARI et al. (2011) ⁽³⁴⁾	660 / 780	15 / 70	37,5 até 175	3,8 até 17,5	Avaliar o efeito do LBP em diferentes parâmetros na proliferação de mioblastos	Sem alteração na proliferação celular
FERREIRA et al. (2009) ⁽³⁵⁾	660 / 780	15 / 70	37,5 até 175	3,8 até 17,5	Avaliar o efeito do LBP na viabilidade de mioblastos	Sem alteração na viabilidade celular

*: Cluster 40 LEDs; CK: Creatina quinase; λ: Comprimento de onda; mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

A FBM é muito utilizada para modular diferentes processos e doenças, porém ainda não se tem um consenso sobre a otimização dos parâmetros utilizados, especialmente no que se refere ao reparo muscular^(15, 20, 30, 31).

Estudos *in vitro* nos oferecem um ambiente controlado no qual podemos isolar as células musculares e estudar processos importantes como a proliferação e diferenciação destas células que são imprescindíveis para o processo de reparo muscular. As células C2C12 tem a capacidade de proliferar e diferenciar *in vitro*, representando um bom modelo para se estudar o reparo muscular frente a utilização da FBM.

Estudos experimentais como o presente provam importantes conhecimentos acerca dos efeitos da FBM sobre as respostas celulares que poderão auxiliar de forma translacional no estabelecimento de novos estudos clínicos e protocolos a serem utilizados.

Estudar e comparar os efeitos de diferentes fontes de luz como o LED e laser permite um melhor embasamento para a escolha baseada nos efeitos, custo e facilidade de aplicação. LEDs em geral apresentam um baixo custo se comparado com o LBP além da possibilidade de customização de *clusters*, o que permitem a sua aplicação em grandes grupos musculares.

Assim este estudo visa preencher uma lacuna sobre os efeitos da FBM utilizando diferentes parâmetros dosimétricos sobre importantes eventos celulares do processo de reparo muscular que incluem a migração (proliferação) celular e fusão de mioblastos (diferenciação)

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos da FBM sobre a migração e fusão de mioblastos C2C12.

2.2 Específicos

Avaliar de forma comparativa os efeitos da FBM utilizando diferentes fontes de luz e parâmetros dosimétricos sobre a fusão e migração de mioblastos.

3. METODOLOGIA

3.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo *in vitro*, controlado e cego que foi realizado no laboratório de Pesquisa do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, Campus Vergueiro, São Paulo-SP.

3.2 Cultura celular

Para o estudo, foi utilizada a linhagem de células precursoras miogênicas (células satélites de camundongo) C2C12 (ATCC® CRL-1772™).

As células C2C12 foram cultivadas em meio de proliferação composto por meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), e 1% de solução antibiótica (Penicilina-Estreptomicina) e mantida em estufa a 37°C em uma atmosfera umidificada em 5% de CO² (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, OH, EUA). O controle da proliferação celular foi realizado utilizando um microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA).

As células utilizadas para os experimentos apresentaram viabilidade superior a 95%, verificada por meio da utilização de azul de tripan (Dinâmica Química Contemporânea®, Indaiatuba, SP, Brasil).

3.3 Grupos experimentais

As células C2C12 foram analisadas em diferentes grupos experimentais que consistiram em: (a) controle do grupo LBP (C2C12 não irradiadas); (b) LBP I (40 mW, 0.4 J de energia total); (c) LBP II (70 mW, 0.4 J de energia total); (d) controle do grupo LED (C2C12 não irradiadas) (e) LED I (40 mW, 0,4 J de energia total) e (f) LED II (70 mW, 0.4 J de energia total).

Para os experimentos, as células C2C12 foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato PBS 1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,4 mM; pH 7,4), desaderidas (0,1% tripsina/EDTA), centrifugadas à 1200 rpm durante 5 minutos em 4° C (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e ressuspensas em 1 ml de DMEM para então serem contadas na câmara de Neubauer, sendo utilizadas 4x10⁴ células/poço para os experimentos de índice de fusão pela coloração de May Grunwald-Giemsa e 1,4x10⁵ células/poço para os experimentos de avaliação da migração celular pelo ensaio de ferida.

3.4 Procedimento de irradiação

A) FBM utilizando LBP

As células de todos os grupos experimentais submetidas a FBM com LBP, assim como o grupo controle, foram centrifugadas (1200 rpm, 5 min, 4° C) para a formação de precipitado celular no fundo do tubo cônico falcon (KASVI® 50mL) e então os grupos tratados com LBP foram irradiados com o cabeçote posicionado em contato e perpendicularmente para atingir diretamente as células e reduzir a interferência do meio de cultivo⁽³⁶⁾.

O equipamento utilizado para a FBM foi o *Twin Laser* (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil) e os seus parâmetros utilizados estão descritos na tabela 2. A potência de saída foi verificada através do *LaserPowerMeter* (Coherent, Portland, EUA) antes de sua utilização e os experimentos foram realizados em ambiente com obscuridade parcial.

As células dos grupos irradiados com o LBP, assim como o controle, foram ressuspensas, plaqueadas (4x10⁴/poço para o índice de fusão e 1,4x10⁵ para a migração celular) em placas de seis poços (KASVI *Tissue Culture Plate 6 well* K12-006) e incubadas em estufa a 37°C em uma atmosfera umidificada em 5% de CO₂, para posteriores avaliações. Cada grupo foi avaliado em duplicata, em três experimentos independentes.

Tabela 2. Parâmetros dosimétricos do LBP

Medida	LBP1	LBP2
Comprimento de onda (nm)	780	780
Modo de emissão	Contínuo	Contínuo
Área de feixe (cm ²)	0,04	0,04
Potência de saída (mW)	40	70
Densidade de potência (W/cm ²)	1	1,75
Densidade de energia (J/cm ²)	10	10
Energia por ponto (J)	0,4	0,4
Total de pontos	1	1
Tempo de exposição por ponto (s)	10	5,7
Tempo Total (s)	10	5,7
Energia total (J)	0,4	0,4

B) FBM utilizando LED

As células de todos os grupos foram plaqueadas (4×10^4 /poço para o índice de fusão e $1,4 \times 10^5$ para a migração celular) em placas de 35mm (Corning Cell Culture Dish, 35mm, NY, EUA), incubadas por 3 horas e mantidas em estufa a 37°C em uma atmosfera umidificada em 5% de CO₂ (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, OH, EUA) para permitir a adesão celular.

Após esse período o meio de cultura foi removido, para não ter interferência do meio na absorção dos fótons⁽³⁶⁾, e então os grupos tratados foram irradiados com o LED nos parâmetros descritos na tabela 3. As irradiações foram realizadas na parte superior das placas para que o feixe do LED conseguisse atingir toda a placa de cultura. Após a aplicação do LED, o meio de cultura foi retornado para a placa.

A potência de saída foi verificada com o *LaserPowerMeter* antes de sua utilização. As placas de cultura foram posicionadas a uma distância de 3,1 cm, de modo que se mantenham na mesma distância do *LaserPowerMeter* durante sua aferição de potência. Todos experimentos foram realizados em ambiente com obscuridade parcial.

As células dos grupos irradiadas com LED assim como o controle, foram incubadas em estufa a 37° em uma atmosfera umidificada em 5% de CO₂, para posteriores avaliações e cada grupo foi avaliado em triplicata.

Tabela 3. Parâmetros dosimétricos do LED

Medida	LED1	LED2
Comprimento de onda (nm)	850	850
Modo de emissão	Contínuo	Contínuo
Área de feixe (cm ²)	3	3
Potência de saída (mW)	40	70
Densidade de potência (mW/cm ²)	13	23
Densidade de energia (mJ/cm ²)	133	133
Energia por ponto (J)	0,4	0,4
Total de pontos	1	1
Tempo de exposição por ponto (s)	10	5,7
Tempo Total (s)	10	5,7
Energia total (J)	0,4	0,4

3.5 Coloração May-Grunwald e Giemsa

Dentre os diversos métodos para quantificar a diferenciação miogênica em estudos *in vitro* com C2C12, o cálculo do índice de fusão consiste na contagem dos núcleos através de fotografias após a coloração das células⁽³⁷⁾.

Com os corantes May-Grunwald e Giemsa, é possível analisar a morfologia das células, evidenciando os núcleos e estruturas dos mioblastos e sua diferenciação, facilitando o cálculo dos índices de fusão e a proporção da distribuição de núcleos^(37, 38).

Após os procedimentos descritos em 3.4, foram aguardados os períodos de incubação (24, 48 e 72h) e então a análise de fusão celular, foi realizada com os corantes May-Grunwald e Giemsa de todos os grupos experimentais (LED e LBP). O sobrenadante contido nos poços foi descartado e as células foram lavadas com PBS 1X gelado e fixadas com a adição de 1mL de álcool metílico (Synth, Diadema, SP, Brasil) por 5 minutos. Em seguida as células foram coradas com o May-Grunwald diluído 1:3 em solução tampão sódio-fosfato (NaH₂PO₄, 1 mM; Na₂HPO₄, 1 mM; pH 5,8) por 5 minutos. Ao término desse período, os poços foram lavados duas vezes com água destilada, e então adicionado 1mL do corante Giemsa (Renylab, Barcelona, MG, Brasil) diluído 1:20 em solução tampão sódio-fosfato durante 10 minutos. Por fim, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X e as placas foram secas em temperatura ambiente

Após o processo de coloração May-Grunwald Giemsa, cinco imagens por placa foram obtidas em regiões aleatórias dos poços dos grupos experimentais, utilizando o microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA), com a magnificação de 20x e correção de 1,5x, em seguida as imagens foram analisadas com o auxílio do software *Image Processing and Analysis in Java (Image J)*.

3.5.1 Cálculo do índice de fusão

Com as imagens no software *Image J*, um avaliador cego, previamente treinado, prosseguiu com a contagem da quantidade total de núcleos presentes em cada imagem. Com base nos núcleos contados, as células foram divididas em três classes: mioblastos mononucleados (apenas 1 núcleo), binucleados (2 núcleos) e multinucleados (acima de 2 núcleos).

Após a divisão dos núcleos em três classes, a distribuição deles foi calculada da seguinte forma: Número de núcleos de mioblastos dividido pelo total de núcleos presentes na imagem multiplicado por 100^(39, 40).

Depois de ter sido calculada a distribuição dos núcleos, foi realizado o cálculo do índice de fusão, que consiste da soma dos mioblastos binucleados e multinucleados.

3.6 Migração celular

Uma maneira eficaz, reproduzível e muito utilizada para avaliar a migração celular é o ensaio de ferida (*Scratch assay*). Para a realização desse ensaio, a ferida é simulada ao raspar com a ponteira de uma pipeta (10-200 μ l) o centro da placa de cultura, então a migração celular se inicia de maneira perpendicular à borda da ferida^(41, 42).

Após os procedimentos descritos em 3.4, foi aguardado um período de 24 horas, para que as células proliferassem na placa de cultura, e então a análise de migração celular foi realizada pelo ensaio de ferida em todos os grupos experimentais (LED e LBP). Para este ensaio a ferida foi gerada por meio de um “arranhão” provocado por uma ponteira de pipeta (200 μ l) no

centro de cada poço. Os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X para retirada das células mortas e adicionado um meio de cultura (DMEM) fresco para as placas de cultura voltarem para estufa até completar os períodos de avaliação. As imagens da área da ferida foram obtidas imediatamente após a ferida e nos períodos de 6, 12 e 24h após sua indução⁽⁷⁾

Duas imagens por placa (na região central) foram capturadas com o microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA), com a magnificação de 10x e processadas no software *Image J*. Em seguida três medidas em pontos fixos foram traçadas na região da ferida (Figura 1) para verificar o comprimento em pixels de cada uma para então ser calculada uma média da quantidade de pixels por foto.

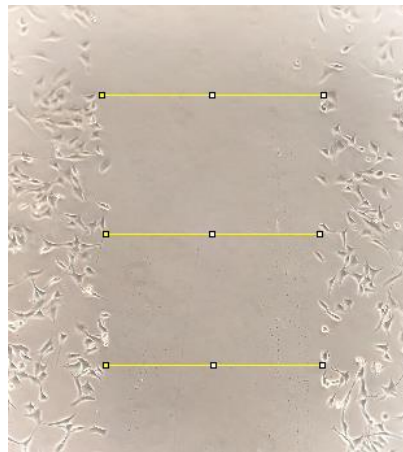


Figura 1. Medidas para calcular a distância em pixels utilizando o *software Image J* (NIH).

3.7 Fluxograma experimental

De acordo com a figura 2, podemos observar o fluxograma do experimento.

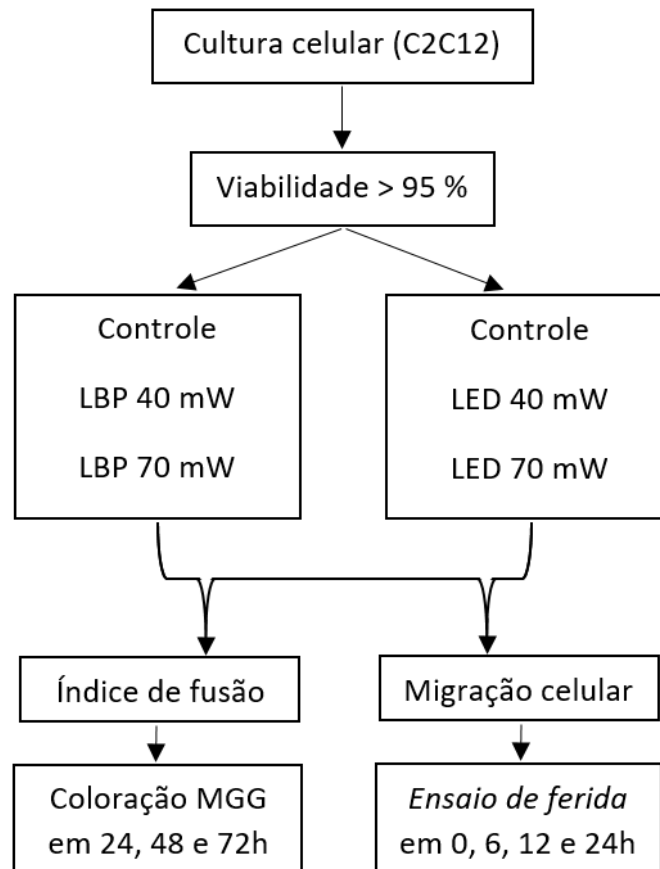


Figura 2. Fluxograma dos grupos experimentais

3.8 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software *GraphPad Prism 5.01®* (*GraphPad Software, San Diego, CA*) sendo que valores médios e de erro padrão foram calculados para todos os experimentos, sendo estes realizados em triplicata e cada experimento com amostras em duplicatas. O teste de *Kolmogorov-Smirnov* foi utilizado para determinar a normalidade dos dados analisados (paramétricos) e as informações foram expressadas em média e erro padrão da média. Os dados foram comparados entre os grupos utilizando ANOVA uma via seguido pelo pós teste *Tukey*.

4. RESULTADOS

4.1 Artigo 1 (Em processo de submissão para revista *Photochemistry and Photobiology*)

Efeitos da fotobiomodulação utilizando diferentes parâmetros dosimétricos sobre a diferenciação e migração de células precursoras miogênicas

Lovisetto, RDP¹; Santos, TC²; Andreo, L²; Rodrigues, MFSD²; Bussadori, SK^{1,2},
Fernandes, KPS², Mesquita-Ferrari, RA^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil

*Autor correspondente: raquel.mesquita@gmail.com

RESUMO

O tecido muscular esquelético apresenta alta capacidade de regeneração após lesões devido à presença de células satélites (CS) musculares. A fotobiomodulação (FBM) possui efeitos positivos durante o processo de reparo muscular em estudos experimentais e clínicos. O objetivo desse estudo foi avaliar de forma comparativa os efeitos da FBM utilizando diferentes fontes de luz e parâmetros dosimétricos sobre a fusão e migração de mioblastos C2C12. Os mioblastos C2C12 foram cultivados em meio de proliferação (DMEM + 10%SFB) e analisados em diferentes grupos experimentais: (a) controle do laser em baixa potência (LBP); (b) LBP 40 mW; (c) LBP 70 mW; (d) controle do diodo emissor de luz (LED); (e) LED 40 mW; (f) LED 70 mW. As células dos grupos experimentais (b) e (c) foram expostas a uma única irradiação usando um LBP infravermelho (AsGaAl). As células dos grupos (e) e (f) foram irradiadas com o LED infravermelho. Após a irradiação as células foram plaqueadas e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 24, 48 e 72h para avaliação da diferenciação celular pelo índice de fusão e avaliação da migração celular após 6, 12 e 24h de incubação. Os resultados mostraram que as células C2C12 do grupo LBP nas potências de 40 mW e 70 mW apresentaram um índice de fusão aumentado em relação ao grupo controle após 24 h e 72 h e nos grupos LED apenas 70 mW após 72h apresentou um índice de fusão mais elevado do que o controle. Os resultados também mostraram maior migração celular no grupo LBP utilizando 70 mW em comparação com o grupo controle após 6h e 24 h e no grupo LED com 70 mW apenas após 24h. Em conclusão, a FBM utilizada em diferentes fontes de luz e parâmetros dosimétricos foi capaz de aumentar a diferenciação dos mioblastos C2C12 verificada pelo índice de fusão, mas apenas a FBM com 70mW foi capaz de induzir um aumento da migração celular.

ABSTRACT

The skeletal muscle tissue shown a high regeneration capacity after injury due the presence of muscular satellite cells (SC). Photobiomodulation (PBM) has demonstrated positive effects during muscle repair process in experimental and clinical studies. The aim of this study was to evaluate the effects of PBM using different light sources and dosimetric parameters in the differentiation and migration of C2C12 myoblasts. C2C12 myoblasts were cultured in proliferation medium and were analyzed in different groups: (a) low-level laser (LLL) control; (b) LLL 40mW; (c) LLL 70mW; (d) light emitting diode (LED) control; (e) LED 40 mW; (f) LED 70 mW. Cells from groups (b) and (c) were exposed to a single irradiation using an infrared LLL (AsGaAl). Cells from groups (e) and (f) were irradiated with the infrared LED. After irradiation all experimental groups were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24, 48 and 72h to evaluated cell differentiation through the fusion index and cell migration using a scratch assay after 6, 12 and 24h of incubation. The results showed that PBM treated C2C12 cells of the 40 mW and 70 mW groups showed an increased fusion index in comparison to the control group after 24 h and 72 h, and in the LED experimental groups after 72h only 70 mW had an increased fusion index in comparison to the control group ($p < 0,05$). The results also showed higher cell migration in the PBM treated group using 70 mW in comparison to the control group after 6 h and 24 h and in the 70 mW LED group only after 24 h. In conclusion, PBM used in different light sources and dosimetric parameters was able to modulate the differentiation of the C2C12 myoblasts verified by the fusion index, but only PBM 70mW was able to modulate their migration.

INTRODUÇÃO

O músculo esquelético corresponde a aproximadamente 40% da massa do corpo humano, desempenha papéis fundamentais como a geração de força, controle do movimento esquelético e proteção física para outros órgãos uma vez que está localizado anatomicamente imediatamente abaixo da pele⁽¹⁾. Por conta das suas funções, o músculo esquelético representa um dos tecidos frequentemente lesionado e a sua capacidade regenerativa é de importância fundamental para o restabelecimento dessas funções de maneira adequada^(1, 2). No entanto, em algumas situações a regeneração muscular é lenta e pode levar a uma recuperação funcional incompleta tendo a cronificação ou formação de tecido fibroso que interfere diretamente em sua funcionalidade⁽³⁾.

A regeneração do músculo esquelético após a lesão é um processo possível graças a presença de células precursoras conhecidas como células satélites (CS)^(3, 4). As CS permanecem na fibra muscular madura em estado quiescente entre a lâmina basal e o sarcolema e são ativadas após a lesão, iniciando um processo de proliferação e sendo denominadas nesta etapa como mioblastos. Posteriormente, os mioblastos passam pela fase de diferenciação inicial e fusão, se agrupando entre si e resultando na formação de miotubos multinucleados, para então se fundir nas fibras musculares danificadas e até mesmo na formação de novas fibras de forma a promover a regeneração no local⁽³⁻⁹⁾.

A linhagem de mioblastos C2C12 é derivada das CS de camundongo e fornecem um modelo celular estabelecido na literatura para o estudo das principais fases envolvidas na miogênese, devido à sua capacidade de proliferação e diferenciação *in vitro* num processo muito semelhante ao que ocorre *in vivo*^(8, 10-13).

A FBM é uma forma de tratamento que vem sendo muito utilizada no processo de reparo muscular. É considerada um tratamento não invasivo que consiste na aplicação de uma fonte de luz com potência de saída inferior a 500 mW e com o comprimento de onda que varia entre 400 até 1100 nm, com a intenção de estimular o reparo tecidual, na redução do processo inflamatório e

na analgesia, promovendo a cicatrização de feridas e prevenindo a necrose e danos teciduais^(5, 7, 11, 15, 19, 20)

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* relatam efeitos positivos da FBM no tratamento do tecido muscular, sendo eles *in vivo* demonstrando a redução da produção de citocinas inflamatórias⁽²⁶⁾, diminuição da mionecrose, aumento no número de vasos sanguíneos, organização nas fibras de colágeno⁽¹⁹⁾, redução do processo inflamatório agudo⁽²⁷⁾. Já em estudos *in vitro* demonstraram aumento do potencial da membrana mitocondrial⁽²⁸⁾, aumento da viabilidade celular⁽²⁹⁾, aumento na ativação da cadeia respiratória da mitocôndria⁽¹⁶⁾ e ainda assim existe muita controvérsia em sua aplicação devido às diversas combinações de parâmetros da FBM.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi de avaliar de forma comparativa os efeitos da FBM utilizando diferentes fontes de luz e parâmetros dosimétricos sobre a fusão e migração de mioblastos com o intuito de agregar conhecimentos acerca dos efeitos da FBM sobre as respostas celulares que poderão auxiliar de forma translacional no estabelecimento de novos estudos clínicos e protocolos a serem utilizados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura celular

Para o estudo, foi utilizada a linhagem de células precursoras miogênicas (células satélites de camundongo) C2C12 (ATCC® CRL-1772™).

As células C2C12 foram cultivadas em meio de proliferação composto por meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), e 1% de solução antibiótica (Penicilina-Estreptomicina) e mantida em estufa a 37°C em uma atmosfera umidificada em 5% de CO₂ (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, OH, EUA). As células utilizadas para os experimentos apresentaram viabilidade superior a 95%.

Grupos experimentais

As células C2C12 foram analisadas em diferentes grupos experimentais que consistiram em: (a) controle do grupo LBP (C2C12 não irradiadas); (b) LBP I (40 mW, 0.4 J de energia total); (c) LBP II (70 mW, 0.4 J de energia total); (d) controle do grupo LED (C2C12 não irradiadas) (e) LED I (40 Mw, 0,4 J de energia total) e (f) LED II (70 mW, 0.4 J de energia total).

Procedimento de irradiação

A) FBM utilizando LBP

As células de todos os grupos experimentais submetidas a FBM com LBP, assim como o grupo controle, foram centrifugadas (1200 rpm, 5 min, 4° C) para a formação de precipitado celular no fundo do tubo cônico falcon (KASVI® 50mL) e então os grupos tratados com LBP foram irradiados com o cabeçote posicionado em contato e perpendicularmente para atingir diretamente as células e reduzir a interferência do meio de cultivo⁽³⁷⁾.

O equipamento utilizado para a FBM foi o Twin Laser (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil) e os seus parâmetros utilizados estão descritos na tabela 1. A potência de saída foi verificada através do *LaserPowerMeter* (Coherent, Portland, EUA) antes de sua utilização e os experimentos foram realizados em ambiente com obscuridade parcial.

As células dos grupos irradiados com o LBP, assim como o controle, foram ressuspensas, plaqueadas (4×10^4 /poço para o índice de fusão e $1,4 \times 10^5$ para a migração celular) em placas de seis poços (KASVI Tissue Culture Plate 6 well K12-006) e incubadas por 24, 48 e 72h para posteriores avaliações.

Tabela 1. Parâmetros dosimétricos do LBP

Medida	LBP1	LBP2
Comprimento de onda (nm)	780	780
Modo de emissão	Contínuo	Contínuo
Área de feixe (cm ²)	0,04	0,04
Potência de saída (mW)	40	70
Densidade de potência (W/cm ²)	1	1,75
Densidade de energia (J/cm ²)	10	10
Energia por ponto (J)	0,4	0,4
Total de pontos	1	1
Tempo de exposição por ponto (s)	10	5,7
Tempo Total (s)	10	5,7
Energia total (J)	0,4	0,4

B) FBM utilizando LED

As células de todos os grupos foram plaqueadas (4×10^4 /poço para o índice de fusão e $1,4 \times 10^5$ para a migração celular) em placas de 35mm (Corning Cell Culture Dish, 35mm, NY, EUA), incubadas por 3 horas para permitir a adesão celular.

Após esse período o meio de cultura foi removido, para não ter interferência do meio na absorção dos fótons⁽³⁷⁾, e então os grupos tratados foram irradiados com o diodo emissor de luz (LED) nos parâmetros descritos na tabela 2. As irradiações foram realizadas na parte superior das placas para que o feixe do LED conseguisse atingir toda a placa de cultura. Após a aplicação do LED, o meio de cultura foi retornado para a placa.

A potência de saída foi verificada com o *LaserPowerMeter* antes de sua utilização. As placas de cultura foram posicionadas a uma distância de 3,1 cm, de modo que se mantenham na mesma distância do *LaserPowerMeter* durante sua aferição de potência. Todos experimentos foram realizados em ambiente com obscuridade parcial.

As células dos grupos irradiadas com LED assim como o controle, foram incubadas por 24, 48 e 72h para posteriores avaliações.

Tabela 2. Parâmetros dosimétricos do LED

Medida	LED1	LED2
Comprimento de onda (nm)	850	850
Modo de emissão	Contínuo	Contínuo
Área de feixe (cm ²)	3	3
Potência de saída (mW)	40	70
Densidade de potência (mW/cm ²)	13	23
Densidade de energia (mJ/cm ²)	133	133
Energia por ponto (J)	0,4	0,4
Total de pontos	1	1
Tempo de exposição por ponto (s)	10	5,7
Tempo Total (s)	10	5,7
Energia total (J)	0,4	0,4

Coloração May-Grunwald e Giemsa

Após os procedimentos de irradiação, foram aguardados os períodos de incubação (24, 48 e 72h) e então a análise de fusão celular, foi realizada com os corantes May-Grunwald e Giemsa de todos os grupos experimentais (LED e LBP). As células foram lavadas com PBS 1X gelado e fixadas com a adição de de álcool metílico (Synth, Diadema, SP, Brasil) por 5 minutos. Em seguida as células foram coradas com o May-Grunwald diluído 1:3 em solução tampão sódio-fosfato (NaH₂PO₄, 1 mM; Na₂HPO₄, 1 mM; pH 5,8) por 5 minutos. Ao término desse período, os poços foram lavados com água destilada, e então adicionado o corante Giemsa (Renylab, Barcelona, MG, Brasil) diluído 1:20 em solução tampão sódio-fosfato durante 10 minutos. Por fim, os poços foram lavados com PBS 1X e as placas foram secas em temperatura ambiente.

Após o processo de coloração May-Grunwald Giemsa, cinco imagens por placa foram obtidas em regiões aleatórias dos poços dos grupos experimentais, utilizando o microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA), com a magnificação de 20x e correção de 1,5x. Em seguida as imagens foram analisadas por um avaliador cego, previamente treinado, com o auxílio do software Image Processing and Analysis in Java (Image J).

Foi realizada a contagem da quantidade total de núcleos presentes em cada imagem. Com base nos núcleos contados, as células foram divididas em

três classes: mioblastos mononucleados (apenas 1 núcleo), binucleados (2 núcleos) e multinucleados (acima de 2 núcleos). Após a divisão dos núcleos em três classes, a distribuição deles foi calculada da seguinte forma: número de núcleos de mioblastos dividido pelo total de núcleos presentes na imagem multiplicado por 100^(40, 41). Após o cálculo a distribuição dos núcleos, foi realizado o cálculo do índice de fusão, que consiste na soma dos mioblastos binucleados e multinucleados.

Migração celular

Após os procedimentos de irradiação, foi aguardado um período de 24 horas, para que as células proliferassem na placa de cultura, e então a análise de migração celular, foi realizada pelo ensaio de ferida em todos os grupos experimentais (LED e LBP). As imagens da área da ferida foram obtidas imediatamente após a ferida e nos períodos de 6, 12 e 24h após sua indução⁽⁷⁾.

Duas imagens por placa (na região central) foram capturadas com o microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA), com a magnificação de 10x e processadas no software Image J. Em seguida três medidas em pontos fixos foram traçadas na região da ferida para verificar o comprimento em pixels de cada uma para então ser calculada uma média da quantidade de pixels por foto.

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 5.01® (GraphPad Software, San Diego, CA) sendo que valores médios e de erro padrão foram calculados para todos os experimentos, sendo estes realizados em triplicata e cada experimento com amostras em duplicatas. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para determinar a normalidade dos dados analisados (paramétricos) e as informações foram expressadas em média e erro padrão da média. Os dados foram comparados entre os grupos utilizando ANOVA uma via seguido pelo pós teste Tukey.

RESULTADOS

Índice de fusão

As imagens das células coradas com May Grunwald-Giemsa nos diferentes períodos avaliados dos grupos LBP estão demonstradas na figura 3. Por meio da análise das figuras e contagem do índice de fusão (figura 4) foi possível verificar que após o período de 24h de aplicação do LBP (figura 4.A) os grupos 40 mW ($p < 0,01$) e de 70 mW ($p < 0,001$) apresentaram aumento no índice de fusão comparados ao grupo controle. No período de 48h (figura 4.B) os índices de fusão em todos os grupos ficaram próximos, não sendo observado nenhuma diferença significativa entre eles, porém após 72h de cultivo (figura 4.C) os grupos irradiados voltaram a apresentar aumento no índice, sendo que os grupos 40 mW ($p < 0,05$) e 70 mW ($p < 0,01$) apresentaram diferença estatística em comparação ao grupo controle.

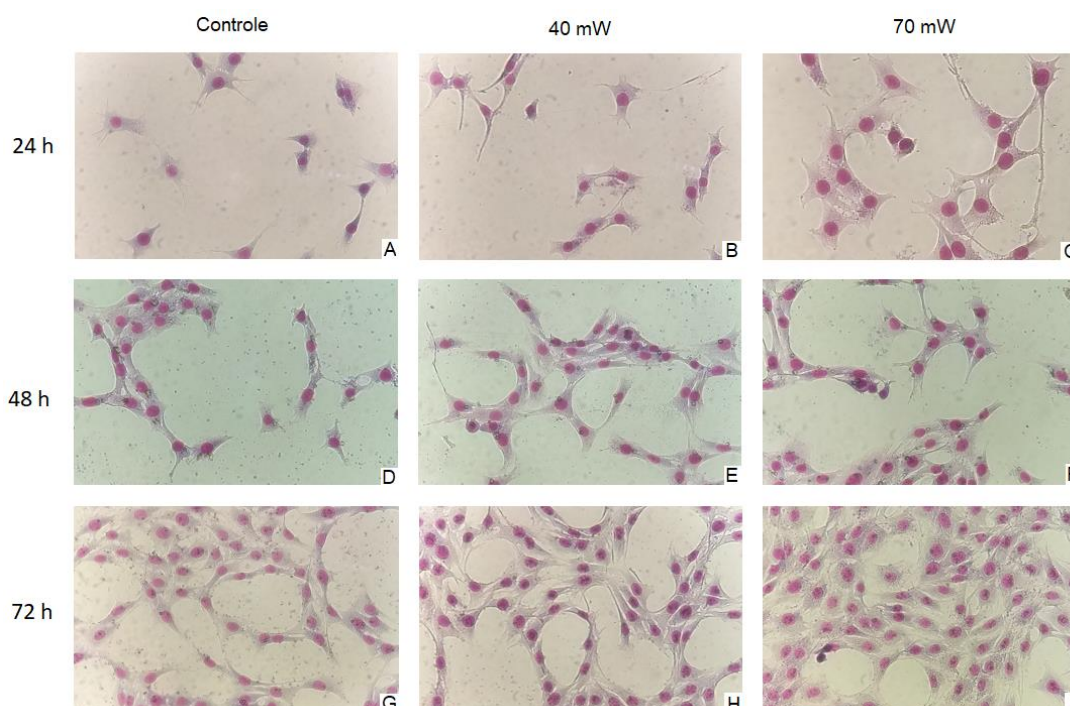


Figura 3. Mioblastos C2C12 corados após os períodos de 24, 48 e 72h após aplicação do LBP; (A) Controle, (B) LBP I 40mW, (C) LBP II 70 mW; após 48h; (D) Controle, (E) LBP I 40 mW, (F) LBP II 70 mW; após 72h; (G) Controle, (H) LBP I 40 mW e (I) LBP II 70 mW.

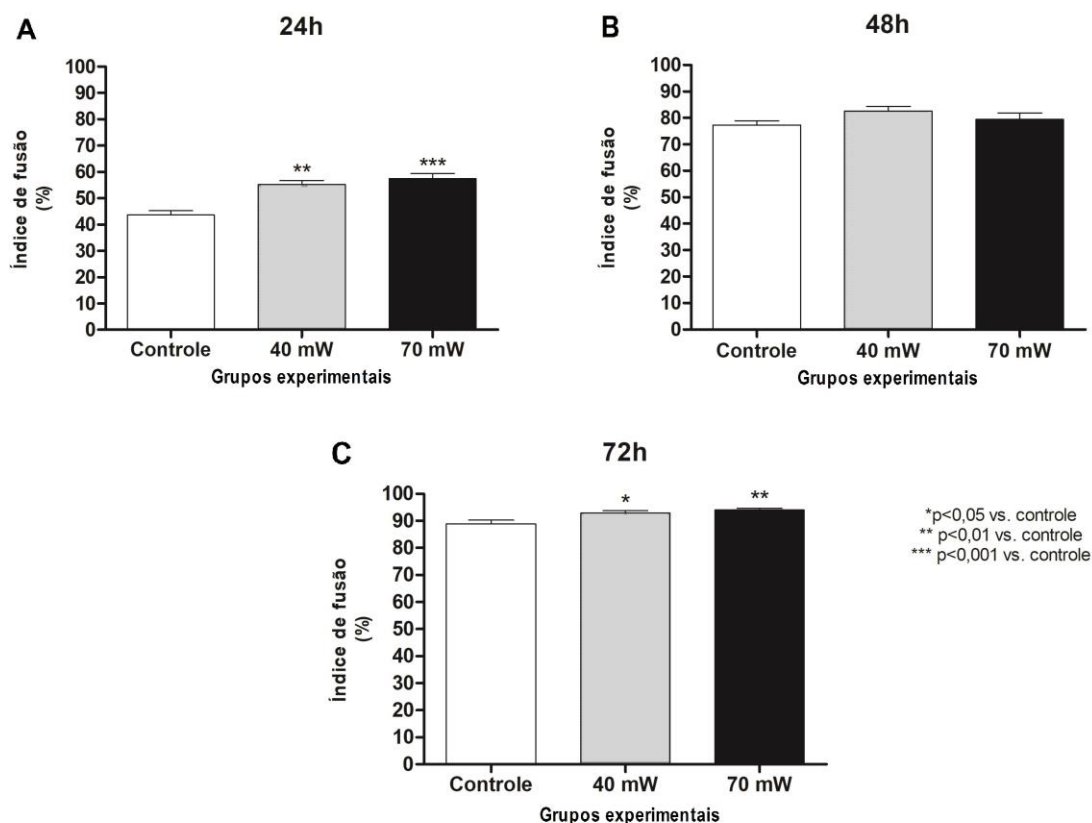


Figura 4. Índice de fusão dos mioblastos C2C12 após aplicação do LBP (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h (ANOVA / Tukey); * $p < 0,05$ vs. controle; ** $p < 0,01$ vs. controle; *** $p < 0,001$ vs. controle.

Seguindo as análises da coloração May Grunwald-Giemsa, na figura 5 podemos observar os diferentes períodos dos grupos irradiados com o LED. Por meio da análise das figuras e contagem do índice de fusão (figura 6) foi possível verificar que após o período de 24h de aplicação do LED (figura 6.A) nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos no que se refere ao índice de fusão. Após o período de cultivo de 48h (figura 6.B), o grupo 70 mW apresentou um aumento no índice de fusão ($p < 0,05$) em relação ao grupo que foi irradiado com 40 mW. Ao completar 72h de cultivo (figura 6.C), o grupo 70 mW apresentou o índice de fusão superior ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle.

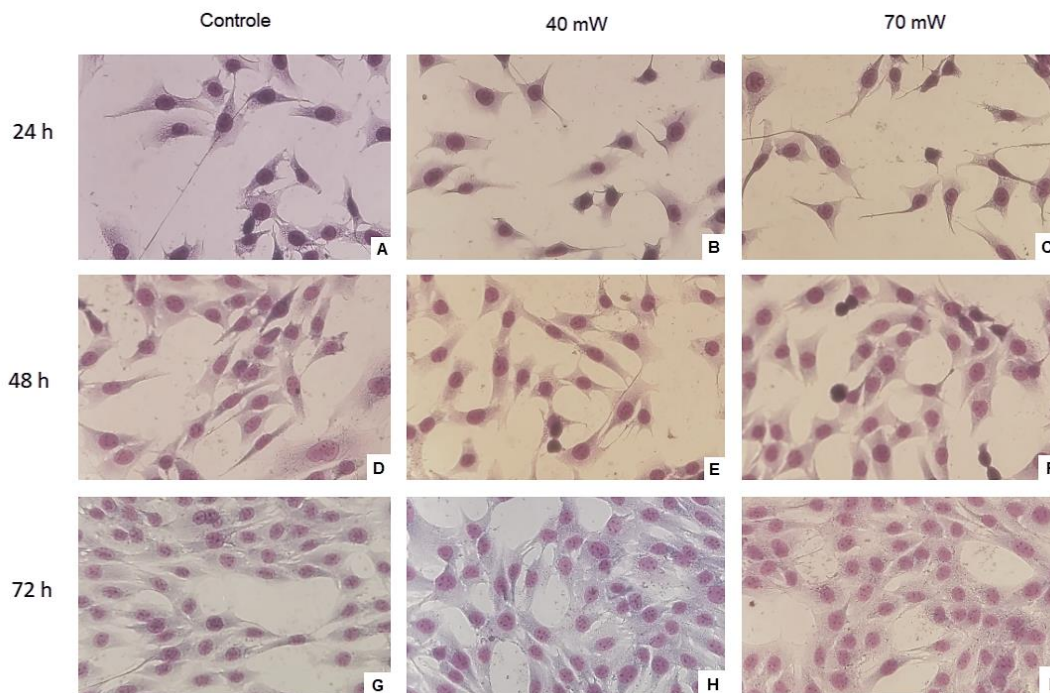


Figura 5. Mioblastos C2C12 corados após os períodos de 24, 48 e 72h após aplicação do LED; (A) Controle, (B) LED I 40mW, (C) LED II 70 mW; após 48h; (D) Controle, (E) LED I 40 mW, (F) LED II 70 mW; após 72h; (G) Controle, (H) LED I 40 mW e (I) LED II 70 mW.

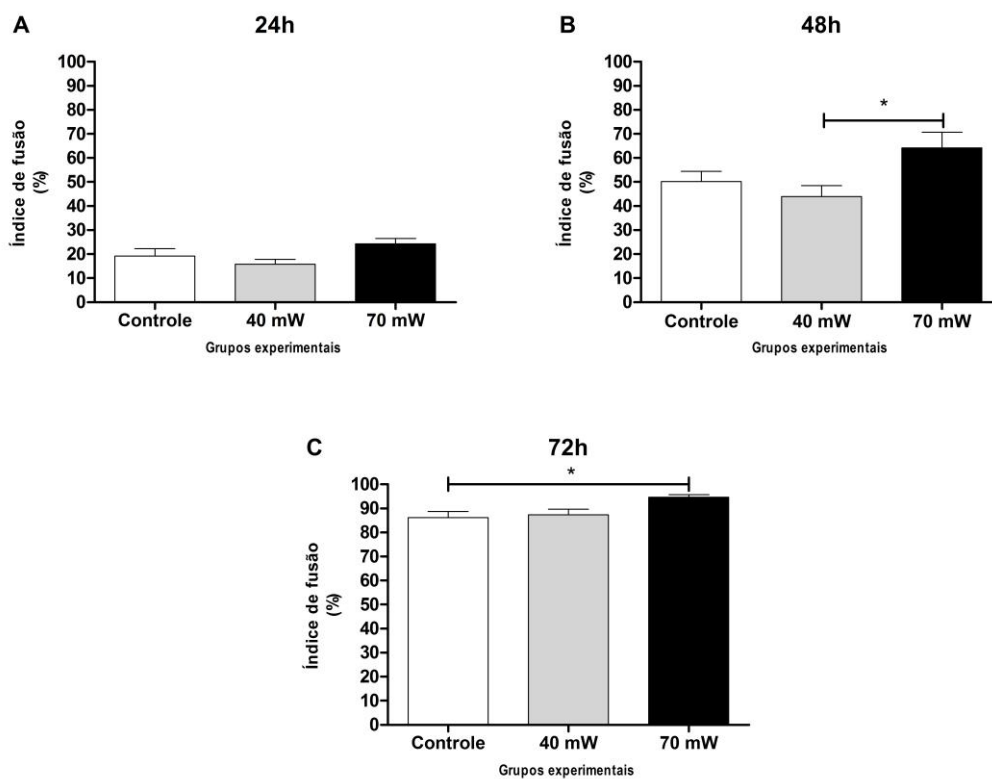


Figura 6. Índice de fusão dos mioblastos C2C12 após aplicação do LED (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h (ANOVA / Tukey); * $p < 0,05$.

Migração celular

As imagens obtidas no ensaio de ferida do grupo LBP estão demonstradas na figura 7 para os diferentes períodos avaliados, incluindo 0h (figura 7 A-C), 6h (figura 7 D-F), 12h (figura 7 G-I) e 24h (figura 7 J-L).

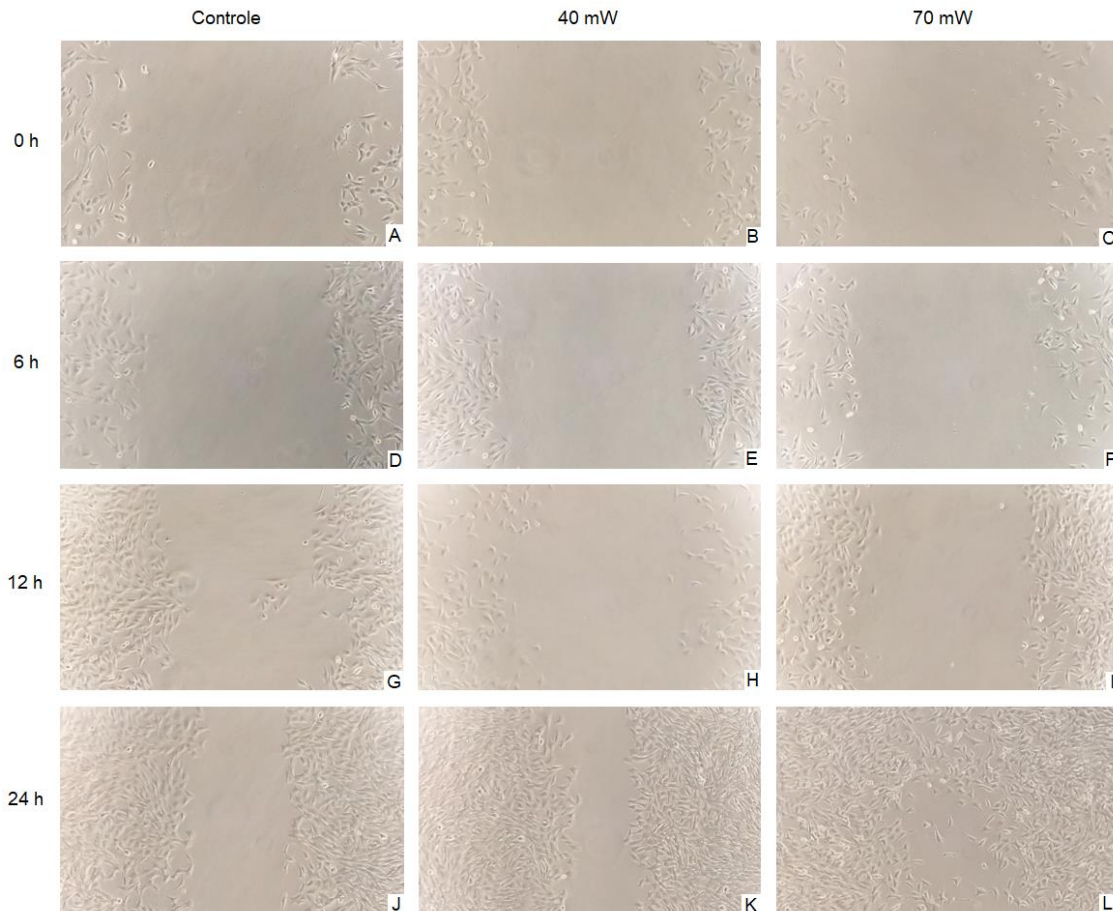


Figura 7. Fechamento da ferida após 0h; (A) Controle, (B) LBP 40 mW (C) LBP 70 mW; após 6h; (D) Controle, (E) LBP 40 mW, (F) LBP 70 mW; após 12h; (G) Controle, (H) LBP 40 mW (I) LBP 70 mW; após 24h; (J) Controle, (K) LBP 40 mW e (L) LBP 70 mW.

Na figura 8 estão demonstrados os resultados obtidos após a mensuração da área de ferida do grupo LBP, sendo possível observar que após um período de 6h (figura 8.A) apenas o grupo laser com 70mW apresentou resultados ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle no que se refere ao aumento da migração. Após o período de 12h não houve diferença estatística entre os grupos. Após um período de 24h de incubação, o grupo 70mW apresentou resultados novamente ($p < 0,01$) em comparação ao grupo controle com fechamentos em muitos pontos da área da ferida.

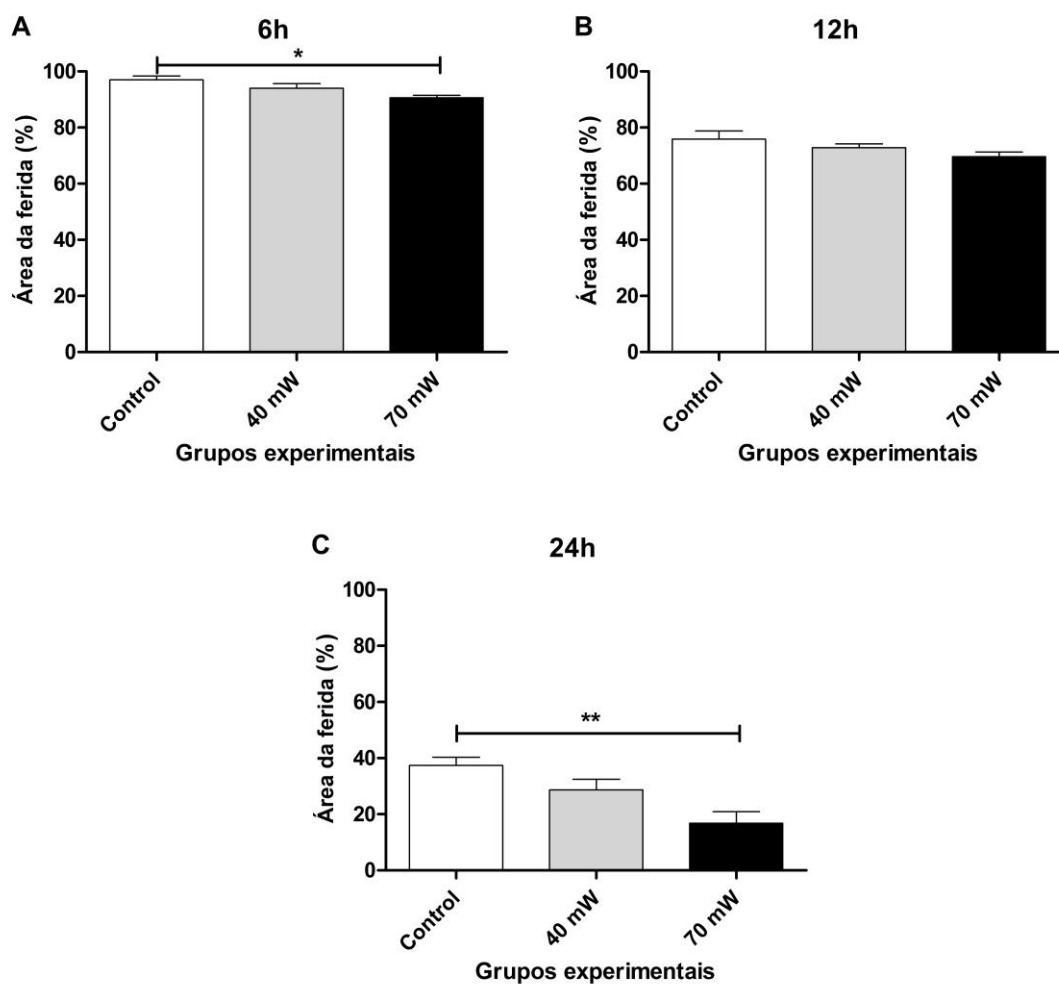


Figura 8. Área da ferida após aplicação do LBP (A) 6h, (B) 12h e (C) 24h (ANOVA / Tukey); * $p < 0,05$ vs. controle ** $p < 0,01$ vs. controle.

As imagens obtidas no ensaio de ferida do grupo LED estão demonstradas na figura 9 para os diferentes períodos avaliados, 0h (figura 9 A-C), 6h (figura 9 D-F), 12h (figura 9 G-I) e 24h (figura 9 J-L).

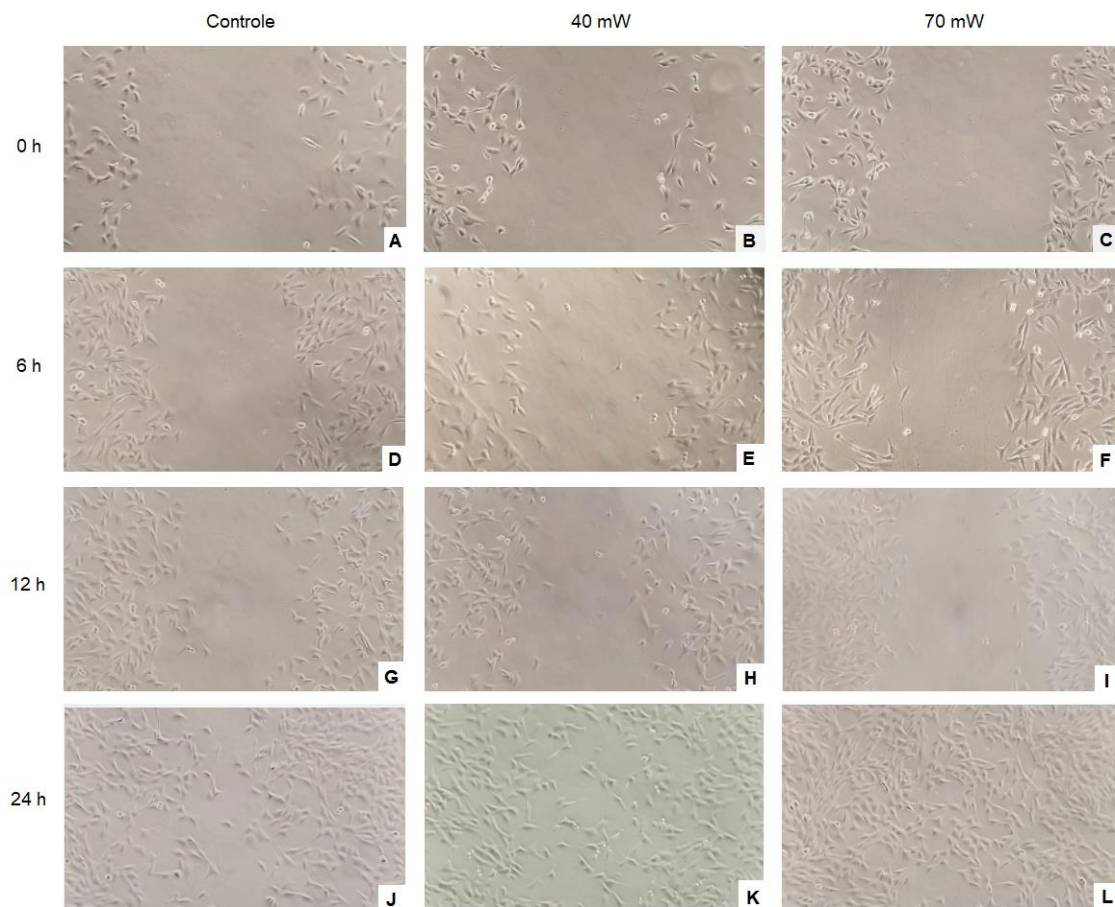


Figura 9. Fechamento da ferida após 0h; (A) Controle, (B) LED 40 mW (C) LED 70 mW; após 6h; (D) Controle, (E) LED 40 mW, (F) LED 70 mW; após 12h; (G) Controle, (H) LED 40 mW (I) LED 70 mW; após 24h; (J) Controle, (K) LED 40 mW e (L) LED 70 mW.

Na figura 10 estão demonstrados os resultados obtidos após a mensuração da área de ferida sendo possível observar que após os períodos de 6h e 12h não houveram diferenças estatísticas entre os grupos. Após um período de 24h de incubação, o grupo 70mW apresentou resultados ($p < 0,05$) no que se refere ao aumento da migração em comparação ao grupo controle.

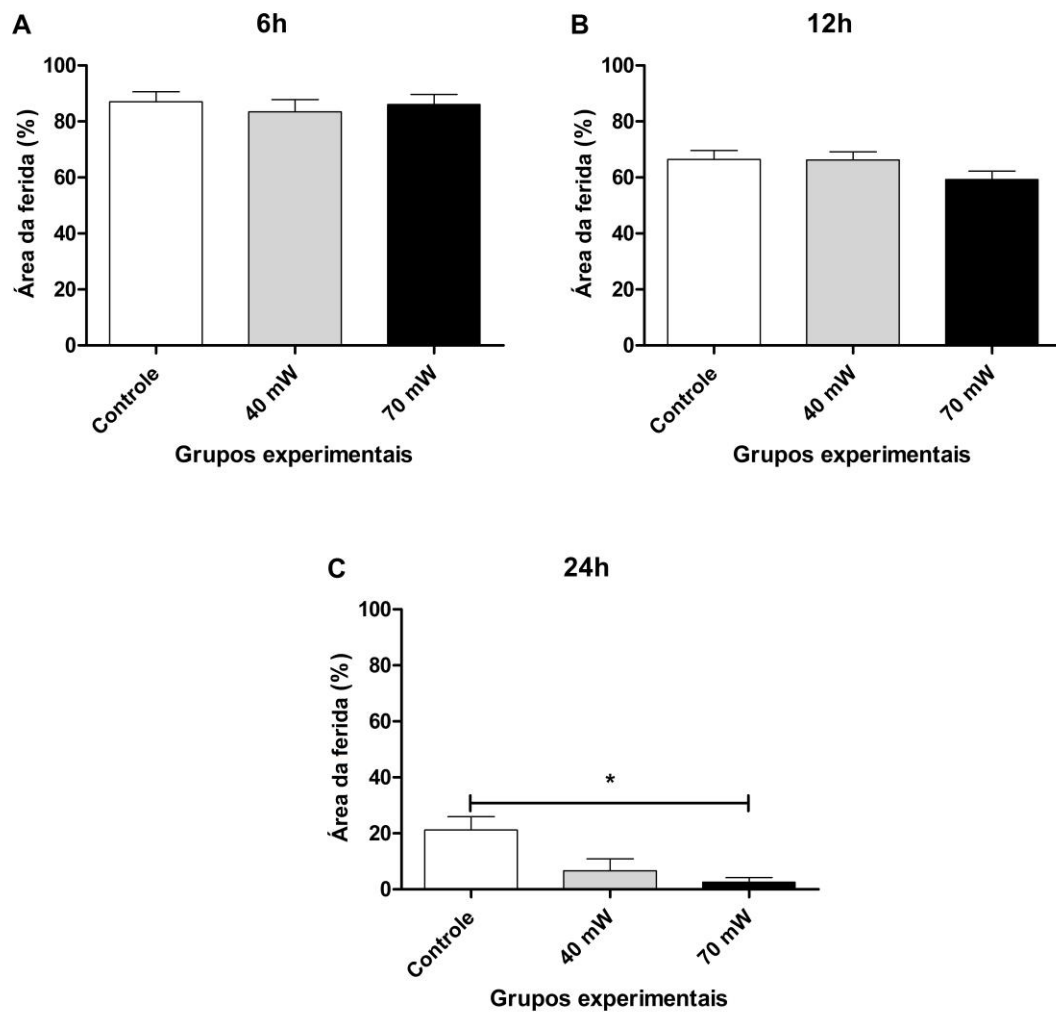


Figura 10. Área da ferida após aplicação do LED (A) 6h, (B) 12h e (C) 24h (ANOVA / Tukey); * p < 0,05 vs. controle.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo, procurou avaliar a proliferação e diferenciação de mioblastos C2C12 irradiados com diferentes fontes de luz em diferentes parâmetros dosimétricos, no intuito de auxiliar futuros estudos na otimização dos parâmetros utilizados na FBM.

Estudos indicam que a FBM afeta a proliferação e diferenciação de células musculares, porém existe uma ampla gama de parâmetros (potência, comprimento de onda, tipo de emissão, densidade de energia, tempo de irradiação, dosagem, energia total entregue, técnica de aplicação e intervalo entre as sessões) que podem ser aplicados, fazendo com que encontremos na literatura estudos com resultados distintos⁽³¹⁾.

No presente estudo as células C2C12 foram irradiadas com ondas do espectro infravermelho de duas fontes de luz distintas (LBP e LED), sendo que dois parâmetros de potência de saída diferentes (40 e 70 mW) foram utilizados em cada fonte de luz, com o objetivo de analisar o índice de fusão e migração dessas células.

Em relação ao índice de fusão, foi possível observar que as potências de 40 mW e de 70 mW no LBP apresentaram um maior índice de fusão em relação ao grupo controle nos períodos de 24 e 72h após a irradiação. Esses dados diferem dos encontrados com a aplicação do LED, uma vez que nos períodos de 24h e 48h não foram encontradas diferenças entre as potências em relação ao grupo controle, porém no período de 48h a potência de 70 mW demonstrou-se mais eficaz para o aumento do índice de fusão se comparado com a potência de 40 mW, e apenas após o período de 72h o grupo irradiado com o LED de 70 mW apresentou resultados superiores ao grupo controle.

Estudo conduzido por Silva (2016)⁽³²⁾, utilizou o LBP em diferentes parâmetros (685 ou 830 nm; 35 ou 100 mW) para avaliar a diferenciação dos mioblastos C2C12 em soro de cavalo expostos a veneno de serpente. Foi observado que apenas os grupos tratados com o LBP mantiveram a diferenciação celular induzida pelo soro de cavalo. Os parâmetros utilizados por este estudo se assemelham com os apresentados no presente estudo que foram positivos para o aumento do índice de fusão dos mioblastos C2C12.

Em relação ao ensaio de ferida, os resultados encontrados nesse estudo demonstram que o LBP foi eficaz no aspecto de migração celular apenas na potência de saída de 70 mW nos períodos de 6 e 24h após a ferida se comparadas com o grupo controle. Nos grupos irradiados com LED, os resultados foram semelhantes, uma vez que o LED de 40mW também não induziu diferenças em relação ao grupo controle, porém na potência de 70 mW no período de 24h foi encontrado aumento significativo da migração celular quando comparado ao grupo controle.

Um estudo conduzido por Ferreira (2018)⁽⁷⁾, demonstra que o LBP não afetou a viabilidade celular, porém reduziu a migração (ensaio de ferida) e proliferação das células C2C12. Essa discrepância em relação à migração e proliferação celular encontrada no presente estudo, pode ser explicada pela diferença nos parâmetros dosimétricos utilizados por estes autores (comprimento de onda 660 nm e potência 20 mW).

Se aplicarmos parâmetros incorretos para a FBM, é provável que o tratamento seja ineficaz. Existe uma curva de resposta bifásica em relação às doses muito baixas ou muito altas de fluência (J/cm^2) ou irradiância (mW/cm^2), o que pode levar a efeitos inibitórios indesejáveis^(14, 43). Basicamente essa resposta bifásica à dose, descreve que para cada tecido existe um nível ideal de dose, e quando aplicamos a FBM a dose precisa ser aumentada até encontrar esse nível, porém se a dose exceder esse valor ideal, a resposta no tecido alvo diminui, desaparece ou pode ser até possível que efeitos negativos ou inibitórios sejam produzidos⁽¹⁴⁾. Quando observados os resultados desse estudo, a resposta bifásica da FBM pode explicar em parte estes achados, sendo observada uma inibição da migração celular em potências menores (20mW), manutenção da migração celular em 40 mW e seu aumento em 70 mW.

Os resultados encontrados no presente estudo são de extrema relevância no que se refere ao processo de regeneração muscular, uma vez que este depende diretamente da proliferação e migração das CS ativadas após a lesão e diferenciação (fusão) das fibras musculares para o restabelecimento da área muscular lesionada. De acordo com o nosso estudo, padronizar a utilização de potências mais altas (70mW), tanto para LED quanto

para o LBP em 70 mW, pode ser a melhor escolha para utilização em processos de regeneração muscular.

Em outro estudo⁽³⁴⁾, com o objetivo de avaliar os efeitos do LBP em diferentes parâmetros (15, 25, 40 e 70 mW) na proliferação de mioblastos C2C12 de acordo com a análise mitocondrial, não foram encontrados resultados superiores ao grupo controle, mesmo que um dos parâmetros escolhidos tenha sido 70 mW, a densidade de energia utilizada foi quase duas vezes superior (17,5 J/cm²) ao do presente estudo, esse fato pode ter sido o motivo dos resultados encontrados.

Mesmo sendo observado que até as primeiras 48h o grupo LBP manteve uma porcentagem na avaliação do índice de fusão dos mioblastos C2C12 superior se comparado com o grupo LED, e somente ao completar o período de 72h os dados desses grupos ficaram mais próximos, é importante ressaltar que não é possível realizar uma comparação direta entre as diferentes fontes de luz utilizadas nesse trabalho, uma vez que área de feixe do LBP utilizada nesse estudo é de 0,04 cm² e do LED é 3 cm², a densidade de energia e de potência desses aparelhos são diferentes, mesmo que a energia final calculada seja 0,4 J em ambos.

No presente estudo a FBM utilizando LBP induziu o aumento do índice de fusão após 24 e 72h (40 e 70mW) e da migração celular após 6 e 24h (70 mW). Utilizando o LED notamos um aumento do índice de fusão após 72h (70 mW) e da migração celular após 24h (70 mW).

Embora o desenho do presente estudo tenha se mostrado útil, devemos levar em consideração que a energia entregue pela FBM em todos os grupos foi sempre a mesma (0,4J) e provavelmente variações da energia com variações de potência, devem levar a resultados diferentes dos encontrados nesse estudo.

É importante ressaltar que os dados encontrados em ambiente de cultura celular não podem ser transpostos diretamente a condição clínica uma vez que in vivo outras células e estímulos (hormonal) estarão presentes e influenciarão todo o processo de reparo e resposta a FBM.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou uma intervenção com o uso do LBP e do LED no espectro infravermelho em células C2C12 com dois parâmetros diferentes de potência de saída (40 e 70mW) no que diz respeito à migração e fusão celular.

O tratamento com o LBP foi capaz de surtir efeitos no índice de fusão independente da potência de saída utilizada, porém no que diz respeito à migração celular, apenas a potência de saída de 70mW apresentou resultados. O tratamento com o LED apresentou resultados superiores em relação ao índice de fusão e migração celular, apenas com a potência de 70 mW.

Os dados desse estudo são relevantes para que os próximos estudos possam se basear em melhores parâmetros dosimétricos e assim otimizar a intervenção com o uso da FBM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kim W, Kim J, Park HS, Jeon JS. Development of Microfluidic Stretch System for Studying Recovery of Damaged Skeletal Muscle Cells. *Micromachines* (Basel). 2018;9(12).
2. Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Front Physiol*. 2014;5:68.
3. Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide*. 2009;21(3-4):157-63.
4. Ranzato E, Balbo V, Boccafoschi F, Mazzucco L, Burlando B. Scratch wound closure of C2C12 mouse myoblasts is enhanced by human platelet lysate. *Cell Biol Int*. 2009;33(9):911-7.
5. da Silva Neto Trajano LA, Stumbo AC, da Silva CL, Mencialha AL, Fonseca AS. Low-level infrared laser modulates muscle repair and chromosome stabilization genes in myoblasts. *Lasers Med Sci*. 2016;31(6):1161-7.
6. Abudupataer M, Zou W, Zhang W, Ding S, Zhou Z, Chen J, et al. Histamine deficiency delays ischaemic skeletal muscle regeneration via inducing aberrant inflammatory responses and repressing myoblast proliferation. *J Cell Mol Med*. 2019;23(12):8392-409.
7. Ferreira JH, Cury SS, Vechetti-Junior IJ, Fernandez GJ, Moraes LN, Alves CAB, et al. Low-level laser irradiation induces a transcriptional myotube-like profile in C2C12 myoblasts. *Lasers Med Sci*. 2018;33(8):1673-83.
8. Matsubara T, Urata M, Nakajima T, Fukuzaki M, Masuda R, Yoshimoto Y, et al. Geranylgeraniol-induced Myogenic Differentiation of C2C12 Cells. *In Vivo*. 2018;32(6):1427-31.

9. Kitakaze T, Oshimo M, Kobayashi Y, Ryu M, Suzuki YA, Inui H, et al. Lactoferrin promotes murine C2C12 myoblast proliferation and differentiation and myotube hypertrophy. *Mol Med Rep.* 2018;17(4):5912-20.
10. Zhang J, Xu X, Liu Y, Zhang L, Odle J, Lin X, et al. EPA and DHA Inhibit Myogenesis and Downregulate the Expression of Muscle-related Genes in C2C12 Myoblasts. *Genes.* 2019;10(1).
11. Alessandra da Silva Neto Trajano L, da Silva CL, de Carvalho SN, Cortez E, Mencialha AL, de Souza da Fonseca A, et al. Cell viability, reactive oxygen species, apoptosis, and necrosis in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser. *Lasers in Medical Science.* 2016;31(5):841-8.
12. Salucci S, Baldassarri V, Falcieri E, Burattini S. α -Actinin involvement in Z-disk assembly during skeletal muscle C2C12 cells in vitro differentiation. *Micron.* 2014;68.
13. Alwan R, Bruel AL, Da Silva A, Blanquet V, Bouhouche K. An siRNA-based screen in C2C12 myoblasts identifies novel genes involved in myogenic differentiation. *Exp Cell Res.* 2017;359(1):145-53.
14. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys.* 2017;4(3):337-61.
15. Nguyen LM, Malamo AG, Larkin-Kaiser KA, Borsa PA, Adihetty PJ. Effect of near-infrared light exposure on mitochondrial signaling in C2C12 muscle cells. *Mitochondrion.* 2014;14(1):42-8.
16. Silveira PCL, Ferreira GK, Zaccaron RP, Glaser V, Remor AP, Mendes C, et al. Effects of photobiomodulation on mitochondria of brain, muscle, and C6 astrogloma cells. *Med Eng Phys.* 2019;71:108-13.
17. Huang Y-Y, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society.* 2009;7(4):358-83.

18. Santos ASd, Guimarães-Sousa L, Costa MS, Zamuner LF, Sousa NC, Hyslop S, et al. Photobiomodulation of local alterations induced by BthTX-I, a phospholipase A2 myotoxin from Bothrops jararacussu snake venom: In vivo and in vitro evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;107:2020-5.
19. Andreo L, Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro BG, Benitte A, de Fatima Nogueira T, Franca CM, et al. Effects of myogenic precursor cells (C2C12) transplantation and low-level laser therapy on muscle repair. *Lasers Surg Med*. 2018.
20. Serrage HJ, Joannis S, Cooper PR, Palin W, Hadis M, Darch O, et al. Differential responses of myoblasts and myotubes to photobiomodulation are associated with mitochondrial number. *J Biophotonics*. 2019;12(6):e201800411.
21. Frangez I, Nizic-Kos T, Frangez HB. Phototherapy with LED Shows Promising Results in Healing Chronic Wounds in Diabetes Mellitus Patients: A Prospective Randomized Double-Blind Study. *Photomed Laser Surg*. 2018;36(7):377-82.
22. Whelan HT, Houle JM, Whelan NT, Donohoe DL, Cwiklinski J, Schmidt MH, et al. The NASA light-emitting diode medical program—progress in space flight and terrestrial applications. *AIP Conference Proceedings*. 2000;504(1):37-43.
23. Chaves ME, Araujo AR, Piancastelli AC, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol*. 2014;89(4):616-23.
24. Langella LG, Silva PFC, Costa-Santos L, Goncalves MLL, Motta LJ, Deana AM, et al. Photobiomodulation versus light-emitting diode (LED) therapy in the treatment of temporomandibular disorder: study protocol for a randomized, controlled clinical trial. *Trials*. 2018;19(1):71.
25. Sousa DFM, Goncalves MLL, Politti F, Lovisetto RDP, Fernandes KPS, Bussadori SK, et al. Photobiomodulation with simultaneous use of red and

infrared light emitting diodes in the treatment of temporomandibular disorder: study protocol for a randomized, controlled and double-blind clinical trial. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(6):e14391.

26. Gouveia VA, Pisete F, Wagner CLR, Dalboni MA, de Oliveira APL, Cogo JC, et al. Photobiomodulation reduces cell death and cytokine production in C2C12 cells exposed to Bothrops venoms. *Lasers Med Sci*. 2019.

27. Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Rodrigues M, da Silva DFT, Ribeiro BG, Alves AN, et al. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair. *J Cell Mol Med*. 2018;22(10):4922-34.

28. Ferraresi C, Kaippert B, Avci P, Huang YY, de Sousa MV, Bagnato VS, et al. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. *Photochem Photobiol*. 2015;91(2):411-6.

29. Mesquita-Ferrari RA, Alves AN, de Oliveira Cardoso V, Artilheiro PP, Bussadori SK, Rocha LA, et al. Low-level laser irradiation modulates cell viability and creatine kinase activity in C2C12 muscle cells during the differentiation process. *Lasers Med Sci*. 2015;30(8):2209-13.

30. Jenkins PA, Carroll JD. How to report low-level laser therapy (LLLT)/photomedicine dose and beam parameters in clinical and laboratory studies. (1557-8550 (Electronic)).

31. Zein R, Selting W, Hamblin MR. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. *J Biomed Opt*. 2018;23(12):1-17.

32. Silva LM, Silva CA, Silva A, Vieira RP, Mesquita-Ferrari RA, Cogo JC, et al. Photobiomodulation Protects and Promotes Differentiation of C2C12 Myoblast Cells Exposed to Snake Venom. *PLoS One*. 2016;11(4):e0152890.

33. Monici M, Cialdai F, Ranaldi F, Paoli P, Boscaro F, Moneti G, et al. Effect of IR laser on myoblasts: a proteomic study. *Mol Biosyst*. 2013;9(6):1147-61.

34. Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro R, Souza NH, Silva CA, Martins MD, Bussadori SK, et al. No effect of low-level lasers on in vitro myoblast culture. *Indian J Exp Biol.* 2011;49(6):423-8.
35. 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.
36. Silva DF, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP, Raelle MP, Wetter NU, Deana AM. Effective transmission of light for media culture, plates and tubes. *Photochem Photobiol.* 2012;88(5):1211-6.
37. Velica P, Bunce CM. A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation. *Muscle Nerve.* 2011;44(3):366-70.
38. Piaton E, Fabre M, Goubin-Versini I, Bretz-Grenier MF, Courtade-Saidi M, Vincent S, et al. Guidelines for May-Grunwald-Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology: recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFAQAP). *Cytopathology.* 2016;27(5):359-68.
39. Pansters NA, van der Velden JL, Kelders MC, Laeremans H, Schols AM, Langen RC. Segregation of myoblast fusion and muscle-specific gene expression by distinct ligand-dependent inactivation of GSK-3beta. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(3):523-35.
40. Ono Y, Sakamoto K. Lipopolysaccharide inhibits myogenic differentiation of C2C12 myoblasts through the Toll-like receptor 4-nuclear factor-kappaB signaling pathway and myoblast-derived tumor necrosis factor-alpha. *PLoS One.* 2017;12(7):e0182040.

41. Cory G. Scratch-wound assay. *Methods Mol Biol.* 2011;769:25-30.
42. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-33.
43. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2016;22(3).

8. APÊNDICE

A. Comprovante de publicação como co-autor de estudo utilizando a FBM

Study Protocol Clinical Trial

Medicine®

OPEN

Photobiomodulation with simultaneous use of red and infrared light emitting diodes in the treatment of temporomandibular disorder: study protocol for a randomized, controlled and double-blind clinical trial

Dowglas Fernando Magalhães de Sousa, MS, Marcela Letícia Leal Gonçalves, PhD, Fabiano Politti, PhD, Renan Didier de Paula Lovisetto, Physiotherapist, Kristianne Porta Santos Fernandes, PhD, Sandra Kalil Bussadori, PhD, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, PhD*

Abstract

Introduction: Temporomandibular disorder (TMD) is considered the main cause of orofacial pain of non-dental origin, and a public health problem. The symptomatology is muscular and/or articular pain, restriction of the mandibular range of motion, and changes in the mandibular movement pattern. Due to its complexity there are already treatments using various forms of therapy. Photobiomodulation using light sources, such as low-level laser or light emitting diodes (LED), with different wavelengths, in a single or combined form, allows one more therapeutic resource to be explored. The objective of this study is to evaluate the effects of photobiomodulation with the simultaneous use of red and infrared LEDs, on pain, range of mandibular movements, and on the electrical activity of masticatory muscles in individuals with TMD.

Methods: A randomized, controlled, double-blind clinical trial is proposed, which will involve 33 individuals (n=11 per group) of both sexes, ages 18 to 45 years in 3 groups: LED group; placebo group; and control group, submitted to 6 non-consecutive sessions of photobiomodulation totaling 2 weeks of treatment. The Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders—RDC/TMD will be used to assess and determine the participants' TMD. The pain will be assessed using the Visual Analog Scale – VAS, the mandibular range of motion will be determined with the aid of a digital caliper, and the electrical activity of the masticatory muscles will be verified by electromyography. A mixed plate of 18 red LEDs—660nm and 18 infrared LEDs—850nm with power of 3.5mW per LED, 4.45 mW/cm², radiant exposure of 5.35J/cm², will be used for photobiomodulation. The irradiated area will be 14.13cm², and energy of 75.6 J, in the TMJ region and in the bilateral masseter and temporal muscles. Participants from all groups will be reassessed after the first therapeutic intervention, and at the end of treatment.

Discussion: We expect the use of photobiomodulation with LEDs, infra and red, to reduce pain, improve temporomandibular joint function in patients with TMD, and thus improve the general conditions of the patient.

Abbreviations: EMG = electromyography, LED = light emitting diode, LLLT = low-level laser therapy, RDC/TMD = Research Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorder, TMD = temporomandibular disorder, TMJ = temporomandibular joint.

Keywords: light emitting diode, photobiomodulation, range of mandibular movements, temporomandibular disorder