

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA – UnB  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ANA CAROLINA NASCIMENTO FERNANDES**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA  
LARINGE DE SUÍNOS**

Brasília, Distrito Federal

2024

**ANA CAROLINA NASCIMENTO FERNANDES**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA  
LARINGE DE SUÍNOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

**Orientadora:** Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus

Brasília, Distrito Federal

2024

## FICHA CATALOGRÁFICA

Fernandes, Ana Carolina Nascimento  
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA  
LARINGE DE SUÍNOS / Ana Carolina Nascimento Fernandes;  
orientadora Selma Aparecida Souza Kückelhaus. -- Brasília, 2024.  
117p.

Tese (Doutorado em Ciências Médicas) — Universidade de Brasília, 2024

1. Termografia. 2. Fotobiomodulação.  
3. Efeito agudo e tardio. 4. Tecidos laríngeos. 5. Histologia. 6. Morfometria.  
I. Kückelhaus, Selma Aparecida Souza. II. Título.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**ANA CAROLINA NASCIMENTO FERNANDES**

### **AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA LARINGE DE SUÍNOS**

Tese apresentada em 28 de fevereiro de 2024 como requisito para a obtenção do grau de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pela seguinte banca examinadora:

**Orientadora: Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus**

Universidade de Brasília

Presidente da banca

**Profa. Dra. Maria de Lourdes Lazzari de Freitas**

Membro Externo ao Programa – UnB

**Profa. Dra. Thais Tâmara Castro e Souza Minuzzi**

Ministério da Saúde, Brasil

**Prof. Dr. Amilcar Sabino Damazo**

Membro Externo ao Programa – UnB

**Prof. Dra. Ana Lúcia Carneiro Sarmiento**

Membro Externo ao Programa – UnB

(suplente)

Brasília, 28 de fevereiro de 2024

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha mãe, à minha  
família e aos meus queridos pacientes

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, pela oportunidade de realizar esta pesquisa e este doutorado.

À minha orientadora Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus, por me acolher, orientar de forma amorosa, apoiar, motivar e ser o meu grande direcionamento durante todo este trabalho com sua experiência, dedicação e inteligência.

Ao grupo do Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) da Universidade de Brasília, especialmente a Maria da Glória Silva e Wanessa Felix Cabral que me auxiliaram na confecção dos materiais histológicos e projeto piloto.

Ao grupo do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Otorrinolaringologia (LEO) da Universidade de Brasília, coordenado pelo Prof. Dr. André Luiz Lopes Sampaio, por terem participado da elaboração do projeto desta pesquisa.

À banca examinadora, por doarem o seu tempo para a correção e avaliação deste trabalho.

À Profa Dra. Laila Salmen Espindola do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, pela disponibilidade nas resoluções das minhas questões acadêmicas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da FM/UnB, pelas aulas enriquecedoras.

Aos servidores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da FM/UnB, em especial ao Fábio Willian, por me ensinar a utilizar o Aperio Scanner, para escanear as lâminas utilizadas neste trabalho.

Aos colegas alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da FM/UnB, especialmente a Gabriela Novanta, por todo seu apoio.

Ao CNPq agradeço pelo auxílio financeiro, indispensável para a realização desta pesquisa.

À Granja Miunça, ao Frigorífico Frimelo e todos os seus incríveis colaboradores, por terem cedido toda a estrutura e os animais para a realização desta pesquisa.

Ao Thomas Miliou, representante da Poliscan Brasil Comércio e Serviços de Equipamentos Médicos, por ter, gentilmente, cedido a câmera para a coleta dos dados termográficos deste estudo.

À minha mãe, que lutou bravamente contra o câncer e hoje pode estar aqui presente, realizando esse sonho junto comigo, por ter me ensinado a ser forte, resiliente, disciplinada e sonhadora.

Ao meu irmão e melhor amigo por ser o meu porto seguro desde sempre.

Ao Leandro, que esteve comigo durante esses quatro anos, me apoiando e auxiliando em todas as etapas desta pesquisa.

Às minhas incríveis tias Marinalva, Lola, Elenita, Marilene, Cirlene, Agostinha por todo apoio, carinho e por me ensinarem o valor da união familiar.

À minha querida família: primos-irmãos por estarem sempre ao meu lado vibrando com as minhas conquistas. Neste processo agradeço especialmente ao Marcus por suas contribuições científicas, à Marinna, Anna Paula, Lara e Mirella, por me fortalecerem nos momentos difíceis. À Fernanda que nunca me deixa desistir. À Luciana que foi ombro amigo e apoio diário durante todos esses quatro anos.

A todos os meus queridos pacientes, por me ensinarem e motivarem a estudar sempre e buscar recursos que tornem nossas terapias mais efetivas. Vocês são o meu combustível diário.

Agradeço a Deus, por ter segurado a minha mão e me carregado no colo durante todo esse processo.

“A voz é a expressão da minha alma, o  
que não consigo traduzir em palavras.”

Ana Carolina

## PREFÁCIO

Na prática clínica como fonoaudióloga, observo que muitos pacientes, relatam melhora na qualidade vocal imediata (efeito agudo) após o uso do laser de baixa potência (LBP), referindo sensação de aumento na potência vocal, melhora na ressonância, maior projeção vocal, mudança no ajuste motor e brilho na voz. Contudo, alguns pacientes referem não perceber a diferença na voz e outros relatam piora vocal, no dia seguinte ao uso do laser.

Desde 2008, atuo na área de voz e percebo que os recursos terapêuticos, quando associados aos exercícios vocais, promovem melhora na qualidade vocal de forma mais rápida, ou seja, otimizam o efeito dos exercícios vocais. Logo, baseado na minha experiência clínica, posso afirmar, pela prática baseada em evidências, que antes de utilizar o LBP na terapia de voz a absorção de um nódulo vocal tinha como prognóstico aproximadamente 3 meses para a reabsorção completa do nódulo, já nos casos de pólipos vocais, todos tinham indicação cirúrgica.

Atualmente, utilizando o LBP associado aos exercícios e orientações vocais, tenho experiências de absorção total de nódulos vocais em aproximadamente 12 dias e absorção total de pólipos em 3 meses. Na *performance* vocal observo que alguns pacientes cantores referem sentir menos fadiga e conseguem, junto com o treino e condicionamento vocal, realizar shows de 3 a 4 horas, sem perderem a potência vocal.

Considerando que na fonoaudiologia ainda não temos protocolos clínicos testados e baseados em estudos científicos e que, os protocolos utilizados atualmente, se baseiam em inferências feitas a partir de estudos de outras áreas da saúde, a motivação para este trabalho foi compreender o efeito de diferentes doses e comprimentos de onda dos LBPs, nos tecidos da laringe de um modelo animal, para auxiliar a translação do conhecimento e estabelecer protocolos seguros e eficazes para o tratamento da voz.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Durante a fonação podem ocorrer microlesões e inflamações devido ao uso excessivo da voz, dificultando a vibração correta da mucosa e alterando a qualidade da voz. Higiene vocal, exercícios para redução do esforço fonatório, recursos como o laser de baixa potência (LBP) estão em uso na prática clínica. Tem sido reportada a ação biomoduladora do LBP na redução de dor e do edema. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito, agudo e tardio, de 1 ou 8 doses do laser vermelho (LV) e laser infravermelho (LIV), isolados ou combinados na laringe de suínos jovens e adultos.

**MATERIAIS E MÉTODO:** Estudo descritivo e comparativo, experimental pareado e não pareado, transversal e longitudinal realizado com suínos, randomicamente agrupados em 13 grupos (n = 5) (CEUA/UnB 004/2020). O efeito tardio de 1 ou 8 doses dos LBPs foi avaliado em animais adultos, cuja intervenção ocorreu 91 dias antes da morte dos animais, enquanto que o efeito agudo ocorreu em animais adultos, cuja intervenção ocorreu entre 24 horas (dose única) ou 8 dias (8 doses) antes da morte. Para o estudo avaliou-se a temperatura laríngea, in vivo, antes e depois dos LBPs (4 J) e os aspectos histológicos nos tecidos laríngeos (largura da mucosa, células e matriz extracelular do tecido conjuntivo e do tecido muscular estriado da prega vocal). Os dados histológicos foram compilados e analisados no programa Prism 5,0®.

**RESULTADOS: 1. Avaliação clínica:** temperatura basal foi 12% maior nos suínos jovens; os LBPs isolados causaram eritema e vermelhidão cutânea transitórios (4 animais). **Termografia:** dose única/LV ↑ temperatura nos suínos jovens, assim como as múltiplas doses dos LBPs; nos adultos/8 doses a temperatura ↑ LIV e LV+LIV. **Largura da mucosa:** efeito agudo/1 dose/LIV ↓ mucosa (LIV < LV+LIV e C), ↓ edema; efeito agudo/8 doses/LBPs ↓ mucosa (LBPs < C), ↓ edema e ↑ matriz extracelular; efeito tardio ↓ mucosa com 1 (LV e LV+LIV < C) e 8 doses (LV+LIV < C). **Tecido conjuntivo:** 1 dose/LBPs/agudo ou tardio não afetou os fibroblastos/fibrócitos, a mitose, as fibras colágenas, elásticas e nervosas; 8 doses/LBPs/agudo não afetaram os fibroblastos/fibrócitos e fibras nervosas (LBPs ≈ C), o LIV ↑ colágenas e elásticas (LIV > LV+LIV), os LBPs combinados ↑ mitose (LV+LIV > LIV e C); efeito tardio/LV+LIV/8 doses ↑ fibroblastos/fibrócitos (LV+LIV > LV, LIV e C), as fibras colágenas (LV+LIV > LV e C) e elásticas (LV+LIV > C) e ↓ mitose (LV+LIV < LV); o LV ↑ fibras nervosas (LV > C). **Músculo estriado da prega vocal:** efeito agudo e tardio/LBPs/1 dose causou hipertrofia (LBPs > C), ↓ total/área das fibras (LBPs < C), não afetou os mionúcleos, integridade/justaposição das fibras, fibras nervosas ou as células mitóticas (LBPs ≈ C); de forma aguda, 8 doses dos LBPs não afetaram o total, a integridade/justaposição (LBPs ≈ C), mas hipertrofiaram as fibras (LBPs > C); isolados ou combinados, os LBPs ↑ mionúcleos (LV > C), fibras nervosas (LV e LV+LIV > C) e mitose (LV+LIV > LIV); efeito tardio/LBPs/8 doses não afetaram o total, integridade/justaposição das fibras e células mitóticas, os lasers isolados ↑ mionúcleos (LV e LIV > C), o LIV e os LBPs combinados ↑ área das fibras (LIV e LV+LIV > C), LV ↑ fibras nervosas (LV > C) e LIV ↑ mionúcleos (LIV > LV e LV+LIV).

**CONCLUSÃO:** Diante dos achados considera-se a utilização as múltiplas doses, sobretudo, no tratamento das disfonias inflamatórias (nódulos, pólipos, edemas, paresias e paralisias), enquanto que a dose única ou múltiplas doses na melhoria funcional em indivíduos com alta demanda vocal.

**Palavras-chave:** Termografia. Fotobiomodulação. Efeito agudo e tardio. Jovens e adultos. Morfometria. Tecidos laríngeos. Histologia.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** During phonation, microlesions and inflammation can occur due to excessive use of the voice, making it difficult for the mucosa to vibrate correctly and altering voice quality. Vocal hygiene, exercises to reduce phonatory effort and resources such as low-level laser therapy laser (LLLT) are used in clinical practice. The biomodulatory action of LLLT in reducing pain and edema has been reported. The aim of this study was to evaluate the acute and delayed effects of 1 or 8 doses of red laser (RL) and infrared laser (IRL), alone or in combination, on the larynx of young and adult pigs.

**MATERIALS AND METHODS:** A descriptive and comparative, paired and unpaired experimental, cross-sectional and longitudinal study carried out with pigs randomly grouped into 13 groups (n = 5) (CEUA/UnB 004/2020). The late effect of 1 or 8 doses of LLLTs was assessed in adult animals whose intervention took place 91 days before death, while the acute effect occurred in adult animals whose intervention took place between 24 hours (single dose) or 8 days (8 doses) before death. The study assessed laryngeal temperature in vivo before and after LLLTs (4 J) and histological aspects of laryngeal tissues (mucosal width, cells and extracellular matrix of connective tissue and striated muscle tissue of the vocal fold). The histological data was compiled and analyzed using Prism 5,0®.

**RESULTS: 1. Clinical evaluation:** basal temperature was 12% higher in young pigs; isolated LLLTs caused transient skin erythema and redness (4 animals).

**Thermography:** single dose/RL ↑ temperature in young pigs, as well as multiple doses of LLLTs; in adults/8 doses the temperature ↑ IRL and RL+IRL.

**Mucosal width:** acute effect/1 dose/IRL ↓ mucosa (IRL < RL+IRL and C), ↓ edema; acute effect/8 doses/LLLTs ↓ mucosa (LLLTs < C), ↓ edema and ↑ extracellular matrix; late effect ↓ mucosa with 1 (RL and RL+IRL < C) and 8 doses (RL+IRL < C).

**Connective tissue:** 1 dose/LLLTs/acute or late did not affect fibroblasts/fibrocytes, mitosis, collagen, elastic and nerve fibers; 8 doses/LLLTs/acute did not affect fibroblasts/fibrocytes and nerve fibers (LLLTs ≈ C), IRL ↑ collagen and elastic (IRL > RL+IRL), combined LLLTs ↑ mitosis (RL+IRL > IRL and C); late effect/RL+IRL/8 doses ↑ fibroblasts/fibrocytes (RL+IRL > RL, IRL and C), collagen fibers (RL+IRL > RL and C) and elastic fibers (RL+IRL > C) and ↓ mitosis (RL+IRL < RL); the RL ↑ nerve fibers (RL > C).

**Vocal fold striated muscle:** acute and late effect/LLLTs/1 dose caused hypertrophy (LLLTs > C), ↓ total/fiber area (LLLTs < C), did not affect myonuclei, fiber integrity/adjustment, nerve fibers or mitotic cells (LLLTs ≈ C); acutely, 8 doses of LLLTs did not affect total, integrity/adjustment (LLLTs ≈ C), but hypertrophied the fibers (LLLTs > C); alone or in combination, LLLTs ↑ myonuclei (RL > C), nerve fibers (RL and RL+IRL > C) and mitosis (RL+IRL > IRL); late effect/LLLTs/8 doses did not affect total, fiber integrity/adjustment and mitotic cells, lasers alone ↑ myonuclei (RL and IRL > C), IRL and combined LLLTs ↑ fiber area (IRL and RL+IRL > C), RL ↑ nerve fibers (RL > C) and IRL ↑ myonuclei (IRL > RL and RL+IRL).

**CONCLUSION:** Considering the results, the use of multiple doses is considered, above all, in the treatment of inflammatory dysphonia (nodules, polyps, edema, paresis and paralysis), while single or multiple doses are used for functional improvement in individuals with high vocal demand.

Keywords: Thermography. Photobiomodulation. Acute and delayed effects. Young people and adults. Morphometry. Laryngeal tissues. Histology.

## SUMÁRIO

-	PREFÁCIO	ix
-	RESUMO	x
-	ABSTRACT	xi
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
2.1.	Objetivo geral	10
2.2.	Objetivos específicos	10
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>11</b>
3.1.	Fluxograma do estudo	12
3.2.	Tipo de estudo e princípios éticos	12
3.3.	Seleção do modelo animal, critérios de inclusão e exclusão	13
3.4.	Grupos de estudo	14
3.5.	Obtenção da temperatura da laringe (termografia)	15
3.6.	Obtenção dos blocos laríngeos e dos espécimes histológicos	18
3.7.	Obtenção das imagens histológicas	19
3.8.	Obtenção dos dados morfométricos	20
3.9.	Análise estatística	23
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>24</b>
4.1.	Observações clínicas durante e após a aplicação do laser de baixa potência	25
4.2.	Efeito do LBP na temperatura da laringe de suínos	25
4.2.1.	Efeito agudo da aplicação de 1 dose do LBP na temperatura da laringe de suínos jovens (90 dias) e adultos (180 dias)	25
4.2.2.	Efeito agudo da aplicação de 8 doses do LBP na temperatura da laringe de suínos jovens (90 dias) e adultos (180) dias	28
4.3.	Efeito do LBP nos tecidos da laringe	34
4.3.1.	Largura da mucosa associada à prega vocal	34
4.3.2.	Tecido conjuntivo	37
4.3.2.1.	Total de fibroblastos / fibrocitos no tecido conjuntivo da laringe de suínos	37
4.3.2.2.	Intensidade da expressão das fibras colágenas/colágeno tipo 1	39
4.3.2.3.	Intensidade das fibras do sistema elástico	41
4.3.2.4.	Intensidade das fibras nervosas na mucosa	43

4.3.2.5.	Intensidade das células em mitose associadas à mucosa	45
4.3.2.6.	Avaliação qualitativa do tecido conjuntivo / células migratórias	47
4.3.3.	Tecido muscular estriado	49
4.3.3.1.	Total de fibras	49
4.3.3.2.	Total de mionúcleos	51
4.3.3.3.	Área das fibras musculares estriadas	53
4.3.3.4.	Integridade / justaposição das fibras musculares	54
4.3.3.5.	Intensidade das fibras nervosas associadas ao músculo estriado	57
4.3.3.6.	Intensidade de células em mitose associadas ao músculo estriado	58
4.4.	Sumário dos resultados	60
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>61</b>
5.1.	Efeito do LBP na temperatura da laringe de suínos	63
5.2.	Efeito do LBP nos tecidos da laringe de suínos	68
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>83</b>
7.1.	Limitações do estudo	83
7.2.	Perspectivas do estudo	84
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>93</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b>	Fluxograma do estudo	12
<b>Figura 2.</b>	Marcação e identificação dos animais – brincadeira, aplicação do LBP e tiragem da fotografia	17
<b>Figura 3.</b>	Processo de obtenção dos blocos laríngeos.	19
<b>Figura 4.</b>	Fotomicrografias das laringes/pregas vocais, representativas dos métodos de coloração	20
<b>Figura 5.</b>	Fotografia mostrando a região selecionada para determinar a largura da mucosa, pela marcação dos 3 pontos equidistantes nas secções histológicas.	21
<b>Figura 6.</b>	Secção histológica do músculo laríngeo com a área (200 $\mu\text{m}^2$ ) utilizada para quantificar o n° de fibras musculares e os diâmetros das fibras	21
<b>Figura 7.</b>	Secção histológica submetida à imunohistoquímica para identificar as fibras nervosas e células em mitose.	22
<b>Figura 8.</b>	Fotografia de um animal com eritema e vermelhidão após a LBP (luz vermelha)	25
<b>Figura 9.</b>	O efeito agudo na temperatura da laringe após aplicação de 1 dose do LBP (LV, LIV o LV+LIV), em animais jovens e adultos tratados ou não tratados	27
<b>Figura 10.</b>	Temperatura basal dos animais jovens e adultos, 2 min e 24 horas após a aplicação dos LBPs	27
<b>Figura 11.</b>	O efeito agudo na temperatura da laringe após aplicação de 8 doses do LBP (LV, LIV o LV+LIV), em animais jovens	30
<b>Figura 12.</b>	Efeito agudo na temperatura da laringe após aplicação de 8 doses do LBP (LV, LIV, LV+LIV) em animais adultos	33
<b>Figura 13.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 dose ou 8 doses na largura da mucosa associada à prega vocal de suínos	35
<b>Figura 14.</b>	Fotomicrografias representativas da largura da mucosa do 1/3 médio da prega vocal da laringe de suínos	36
<b>Figura 15.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses do LBP (LV, LIV, LIV+V) no total de fibroblastos/fibrócitos na mucosa da laringe de suínos	38
<b>Figura 16.</b>	Fotomicrografias representativas do n° de fibroblastos no tecido conjuntivo	39
<b>Figura 17.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses do LBP (LV, LIV, LV+LIV) na intensidade das fibras colágenas	40
<b>Figura 18.</b>	Fotomicrografias representativas da intensidade das fibras colágenas na mucosa da laringe de suínos	41

<b>Figura 19.</b>	Efeito agudo e tardio de dose única ou 8 doses do LBP na intensidade das fibras elásticas	42
<b>Figura 20.</b>	Fotomicrografias representativas da intensidade das fibras elásticas	43
<b>Figura 21.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses dos LBPs (LV, LIV, LV+LIV) na intensidade das fibras nervosas na mucosa	44
<b>Figura 22.</b>	Fotomicrografias representativas da intensidade das fibras nervosas na mucosa	45
<b>Figura 23.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 dose ou 8 doses dos LBPs no total de células em mitose associadas à mucosa	46
<b>Figura 24.</b>	Fotomicrografias representativas do total de células em mitose associadas à mucosa	47
<b>Figura 25.</b>	Fotomicrografias da mucosa laríngea dos grupos controle e tratados com os LBPs (LV, LIV, LV+LIV)	48
<b>Figura 26.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 dose ou 8 doses dos LBPs no total de fibras musculares estriadas	50
<b>Figura 27.</b>	Fotomicrografias representativas do total de fibras musculares, mionúcleos e área da fibra da laringe de suínos do grupo controle	51
<b>Figura 28.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses do LBP no total de mionúcleos do músculo estriado da prega vocal	52
<b>Figura 29.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 dose ou 8 doses na área das fibras musculares estriadas das pregas vocais	54
<b>Figura 30.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses na expressão das fibras reticulares associadas às fibras musculares estriadas das pregas vocais (justaposição/integridade)	55
<b>Figura 31.</b>	Fotomicrografias representativas da integridade/justaposição das fibras musculares estriadas das pregas vocais da laringe de suínos, avaliadas pela expressão das fibras reticulares	56
<b>Figura 32.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses dos LBPs na expressão de fibras nervosas associadas ao músculo estriado das pregas vocais	57
<b>Figura 33.</b>	Fotomicrografias representativas da expressão das fibras nervosas associadas ao músculo estriado das pregas vocais	58
<b>Figura 34.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses no total de células em mitose associadas ao músculo estriado das pregas vocais de suínos, tratados com LBP.	59

<b>Tabela 1.</b>	Distribuição dos animais/grupos, idade, tempo de morte e aplicação do LBP	14
<b>Tabela 2.</b>	Número final de animais/grupo e por análise (termografia e histologia)	23
<b>Tabela 3.</b>	Efeito agudo de dose única na temperatura da laringe de suínos adultos e jovens, antes e depois da LBP	26
<b>Tabela 4.</b>	Efeito agudo de 8 doses do LBP na temperatura da laringe de porcos jovens (90 dias), antes e após a intervenção	29
<b>Tabela 5.</b>	Efeito agudo de 8 doses dos LBPs na temperatura da laringe de porcos adultos (180 dias), antes e após a intervenção	32
<b>Tabela 6.</b>	Efeitos agudo e tardio da aplicação de 1 e 8 doses do laser do LBP na largura da mucosa de suínos adultos	35
<b>Tabela 7.</b>	Efeitos agudo e tardio da aplicação de 1 e 8 doses do LBP na quantidade de fibroblastos/fibrócitos.	37
<b>Tabela 8.</b>	Efeitos agudo e tardio da aplicação de 1 e 8 doses do LBP na quantidade de fibras colágenas	40
<b>Tabela 9.</b>	Efeitos agudo e tardio da aplicação de 1 e 8 doses do LBP na intensidade da das fibras do sistema elástico	42
<b>Tabela 10.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 e 8 doses do LBP na intensidade das fibras nervosas	44
<b>Tabela 11.</b>	Efeitos agudo e tardio de 1 e 8 doses do LBP no total de células em mitose	46
<b>Tabela 12.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 e 8 doses do LPB no total de fibras musculares	49
<b>Tabela 13.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 e 8 doses do LBP no total de mionúcleos	52
<b>Tabela 14.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 e 8 doses do LBP na área das fibras musculares estriadas das pregas vocais	53
<b>Tabela 15.</b>	Efeito agudo e tardio da aplicação de 1 e 8 doses dos LBPs na integridade e justaposição das fibras musculares	55
<b>Tabela 16.</b>	Efeito agudo e tardio de 1 e 8 doses dos LBPs da expressão de fibras nervosas associadas ao músculo estriado da prega vocal	57
<b>Tabela 17.</b>	Efeito agudo e tardio da aplicação de 1 e 8 doses dos LBPs no total de células em mitose associadas ao músculo	59
<b>Tabela 18.</b>	Sumário dos resultados	60
<b>Tabela 19.</b>	Proposta de protocolo para utilizar os LBPs no tratamento de condições clínicas que afetam as pregas vocais.	83

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>LBP</b>	Laser de Baixa Potência
<b>LV</b>	Laser vermelho
<b>LIV</b>	Laser infravermelho
<b>LV+LIV</b>	Laser vermelho e infravermelho combinados
<b>INMET</b>	Instituto Nacional de Meteorologia
<b>SOLATERM</b>	Sociedade Latino-Americana de Termologia e Termografia em Saúde
<b>°C</b>	Grau Celsius ou grau centígrado
<b>J</b>	Joules
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>mm</b>	Milímetros
<b>µm</b>	Micrômetro

## 1. INTRODUÇÃO

A fonação acontece no momento em que o ar que sai dos pulmões, passa pela laringe e promove a vibração das pregas vocais e, para isso, a mobilidade de mucosa deve ser eficiente. A laringe é um órgão musculocartilaginoso, com múltiplas funções, situado na região infra-hióidea (Imamura et al. 2001; Nemetz et al. 2005). Histologicamente, as pregas vocais são dobras da mucosa presentes na luz proximal da laringe, intrinsecamente associadas ao músculo vocal, denominado tireoaritenóideo. É composta, principalmente, por matriz extracelular, fibroblastos e vasos sanguíneos. A borda livre das pregas vocais é reforçada por tecido conjuntivo denso modelado e por tecido elástico, denominado ligamento vocal e, em ação conjunta com os demais músculos intrínsecos da laringe, é responsável pela alteração de tensão, da largura e pelo encurtamento das pregas vocais (Steiner et al. 2013; Bertassoli et al. 2013).

O tecido conjuntivo frouxo integra espaços não ocupados por outros tecidos, sustenta e nutre células epiteliais e, ainda, recobre os nervos, músculos e vasos sanguíneos linfáticos. Além disso, desempenha importante papel em processos de cicatrização. Os fibroblastos, no tecido conjuntivo, têm como principal função produzir colágeno e elastina, que fazem parte da matriz extracelular, sendo, portanto, o principal responsável pela formação das fibras (Kishimoto et al. 2010; Hiwatashi et al. 2015; Hiwatashi et al. 2017; Imaizumi et al. 2021). Há maior proporção de fibras musculares tipo II, que suportam sobrecarga e apresentam contrações rápidas e descontínuas. E, de acordo com sua função motora, podem ser classificadas em fibras tipo IIa, IIb ou IIc (Hoh 2005).

As fibras musculares diferem entre si pela capacidade oxidativa, pela resistência à fadiga e pelo desenvolvimento da tensão. Durante a fonação é comum o surgimento de microlesões e inflamação, que afetam a função motora das fibras musculares e provocam sintomas vocais pelo trauma mecânico resultante do uso da voz por determinado tempo. Assim, o uso profissional da voz, seja falada ou cantada por tempo prolongado, pode gerar fadiga, cansaço vocal, inflamações e edemas (acúmulo de líquido nas pregas vocais), principalmente, por fatores individuais e ambientais, bem como pelas vias aéreas serem expostas a mudanças de umidade e temperatura (Beatrice et al. 2004).

Na presença da inflamação, as bordas livres das pregas vocais tem sua vibração dificultada ou mesmo ausente, afetando assim a qualidade da voz.

Nesse sentido, toda ação que promova a drenagem dos líquidos acumulados no interstício tecidual pode favorecer a resolução da inflamação e restaurar a qualidade vocal (Piva et al. 2011).

Na prática clínica, o tratamento de fadiga vocal varia desde a redução do esforço fonatório até exercícios para o equilíbrio muscular e orientações de higiene vocal, que reduzem a resposta inflamatória (Kagan & Heaton, 2017). Assim, quando um processo inflamatório é desencadeado, o tratamento busca a reparação tecidual de modo a manter a funcionalidade do músculo e tecidos. A inflamação do tecido da laringe, incluindo as pregas vocais, impede a vibração livre da mucosa, o que altera a qualidade da voz. Nesse sentido, toda ação que promova a otimização dessa drenagem e acelere o processo inflamatório, teoricamente, pode trazer importantes benefícios para os tratamentos das alterações vocais (Piva et al. 2011).

A fotobiomodulação (FBM) é uma técnica não invasiva e indolor, que consiste na aplicação de um feixe concentrado de luz (Laser ou LED) num determinado sistema biológico, cujos efeitos podem ser identificados na estimulação, indução ou inibição de um processo bioquímico; seus efeitos bioelétricos estão relacionados a alterações no potencial de membrana das células (Behlau et al. 2022).

Dentre as diversas fontes de luz, na terapia luminosa utiliza-se as fontes de radiação não ionizantes, incluindo a Light Emitting Diodes (LED) e/ou luzes de banda larga, no espectro visível e no infravermelho. Na fonoaudiologia, utiliza-se a forma mais ampla do LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Irradiation) de baixa potência e o LED (Light Emitting Diodes) (Chung et al. 2012).

O laser de baixa potência (LBP) é uma radiação não ionizante, com comprimento de onda maior, não nociva ao organismo, colimada, coerente e monocromática, pois apresenta um comprimento de onda único<sup>14</sup> que se baseia nas seguintes características: 1) a coerência indica que a colimação está relacionada aos raios paralelos e mantém a potência agrupada numa pequena área que percorrerá várias distâncias; 2) a direcionalidade indica que os fótons emitidos são inclinados em relação ao eixo central, não contribuindo para o feixe final indica que o feixe resultante propaga-se na mesma direção ou com dispersão mínima; 3) o monocromatismo indica que os fótons possuem um único

comprimento de onda/cor; 4) a intensidade do laser pode ser modulada e atingir ordens em terawatts ( $10^{12}$  W), mas em luzes pulsadas, quando a energia acumulada é emitida em um curto espaço de tempo (Neves et al. 2005; Azevedo et al. 2006). Especificamente para o laser de baixa potência (LBP), a atividade fotobiomoduladora é evidente em acelerar, de forma direta ou primária, o processo de reparo tecidual, reduzir a dor e a inflamação (efeito analgésico) e cujo efeito, varia de acordo com a forma de administração e dosimetria utilizadas.

O LBP tem sido utilizado como uma possibilidade terapêutica, não invasiva, pontual, fotodinâmica e sistêmica, provocando variação dos níveis de adenosina monofosfato cíclico, aumento na produção de ATP mitocondrial, síntese de DNA, síntese de prostaglandinas, síntese de  $\beta$ -endorfinas, além de estimular os fibroblastos na formação de colágeno e regular os níveis de fibrinogênio. De forma indireta ou secundária, o LBP estimula a vasodilatação da microvasculatura, o tecido de granulação, repara as fibras nervosas dos nervos periféricos, vasos linfáticos, tecido ósseo e aumenta a capacidade fagocitária de macrófagos e linfócitos (Andrade et al. 2014; Ana et al. 2014; Alves et al. 2019).

De forma direta, os LBPs atuam nos cromóforos (organelas citoplasmáticas) presentes nos tecidos biológicos. A interação entre o laser e os cromóforos que possuem a capacidade de absorver a luz em determinados comprimentos de onda, é fundamental para os efeitos terapêuticos, sendo que a correta escolha do comprimento de onda garante a absorção adequada pelos cromóforos. A absorção de energia pela célula promove uma série de reações bioquímicas e fisiológicas no tecido, que podem resultar nos diferentes efeitos terapêuticos desejados. Os comprimentos de ondas mais utilizados na prática clínica fonoaudiológica, na área de voz são o infravermelho e o vermelho (Santos & Sousa 2021).

Considerando que as pregas vocais são compostas principalmente pela mucosa e tecido muscular, não há cromóforos associados como ocorre em outros tecidos biológicos, como a pele (melanina) ou o sangue (hemoglobina) (Angiero et al. 2008). Portanto, é importante ressaltar que a absorção de energia pelo tecido das pregas vocais pode ocorrer de forma não específica, ou seja, a luz emitida pelo LBP pode ser absorvida por diferentes componentes celulares, como a água, as proteínas e os pigmentos naturais presentes nas células. Dessa forma, o LBP

atua de forma geral nas pregas vocais, promove efeitos terapêuticos e pode causar reações ou percepções diferentes em cada indivíduo. Estas, podem estar relacionadas ao fototipo da pele, ao grau de demanda energética / alteração metabólica celular, a profundidade do tecido alvo, a quantidade de tecido adiposo laríngeo / peso corporal, a taxa de gordura corporal e faixa etária (Soares & Frigo, 2022).

A citocromo C oxidase é uma enzima/cromóforo mitocondrial que mais interage com a laserterapia, na cadeia respiratória mitocondrial, que é o processo pelo qual as células convertem nutrientes em energia utilizável na forma de ATP. A função principal da enzima citocromo C oxidase é catalisar a transferência de elétrons para o oxigênio molecular ( $O_2$ ), resultando na formação de água ( $H_2O$ ); esse processo ocorre em várias etapas e envolve a transferência de elétrons por meio de sítios de cobre e ferro presentes na enzima. Além disso, a citocromo C desempenha um papel importante na regulação do metabolismo celular e na resposta ao estresse oxidativo. Também, tem sido mostrado que essa enzima está envolvida nos processos de sinalização celular, na regulação da morte celular controlada (apoptose) e na modulação da resposta inflamatória (Henriques et al. 2010).

Na fonoaudiologia são utilizados diferentes comprimentos de onda e doses, dependendo do tecido alvo e do efeito desejado. Comumente, utiliza-se os LBP infravermelho (LIV) e vermelho (LV) e até mesmo a combinação de ambos (LIV+LV) (Behlau et al. 2022).

O laser infravermelho (LIV), de maior comprimento de onda (860 nm) e menor energia, penetra mais profundamente nos tecidos (5 a 6 cm) como tecidos ósseos (Borges et al. 2018). De uma forma geral, o LIV interage com as mitocôndrias e aumenta a produção do ATP, aumenta o metabolismo celular, interfere na acidez citoplasmática, modula a permeabilidade da membrana celular e afeta a absorção de nutrientes e água. O LIV não age diretamente na mitocôndria, mas sim, de forma indireta, atua nos canais iônicos de sódio e potássio (Alves et al. 2019).

O laser vermelho (LV), que é de menor comprimento de onda (690 nm) e penetra aproximadamente de 3 a 4 cm, aplica-se aos tecidos mais superficiais como a pele e as mucosas. De forma similar ao LIV, o LV atua na membrana

celular e modula o seu potencial, possui ação direta na enzima citocromo C oxidase (Santos & Sousa, 2021).

A potência do laser é a quantidade de energia produzida ou consumida por unidade de tempo, sendo expressa em Watts ou Joules por segundo (J/s) (1 Watt = 1J/s; potência = energia/tempo), enquanto que a dose (quantidade de utilização) é medida em Joules por centímetro quadrado (J/cm<sup>2</sup>) (Camargo et al. 2020).

Na prática clínica, comumente utiliza-se as doses baixas para estimular e as doses altas para inibir os tecidos, já as doses intermediárias aplicam-se aos processos regenerativos. Apesar dessa prática, não existe um protocolo padrão validado que balize o uso do laser na prática clínica vocal (Behlau et al. 2022). Em que pese os estímulos fracos acelerarem e estímulos fortes aumentam os processos fisiológicos, em ambos os casos o patamar do efeito é alcançado; estímulos intensos podem suprimir o efeito desejado. Baseado nisso, o estudo, de Ana et al. (2014), sugeriu diferentes protocolos para a prática clínica para tecidos superficiais (regeneração: 1J a 2J; modulação: 3J a 4J; analgesia: > 4J), com profundidade média (regeneração: 2J a 3J; modulação: 3J a 4J; analgesia: > 5J) e para tecidos profundos (regeneração: 3J a 4J; modulação: 4J a 5J; analgesia: > 6J).

Nos últimos anos, observa-se aumento do uso do LBP na terapia da voz pelos fonoaudiólogos. Alguns terapeutas têm utilizado esse recurso com o objetivo de acelerar a recuperação da voz de indivíduos com alta demanda vocal, profissionais da voz, cantores, atores, radialistas, professores entre outros.

Os relatos de alguns pacientes mostram melhoria imediata na qualidade da voz e uma melhor produção sonora no desempenho de suas funções, enquanto que outros relatam não perceber diferença ou uma melhora imediata acompanhada de piora da qualidade da voz no dia seguinte ao seu uso.

Os estudos disponíveis reportam que o LV pode ter um efeito normalizador nas medidas objetivas e subjetivas da fadiga vocal. Contudo, os resultados de Kagan & Heaton (2017) sugeriram o tratamento com lasers combinados para otimizar o efeito desejado.

Considerando que essa área da ciência é pouco explorada cientificamente, sobretudo, pela impossibilidade de realizar ensaios experimentais

exploratórios com seres humanos. Nesse contexto, estudos com modelos animais que vocalizem e que possuem as laringes com anatomia similar aos humanos, como observado nos suínos, podem fornecer as bases para consolidar os protocolos de tratamento na Fonoaudiologia.

Na laringologia experimental, as abordagens metodológicas mais frequentes baseiam-se, principalmente, em investigar tipos de cirurgia e intervenção nas pregas vocais de cães, ratos e porcos, cirurgia/intervenção com ensaio experimental com duração até 30 dias. O estudo de revisão de Fernandes et al. (2022) analisou 26 estudos em que cinco grupos de animais foram utilizados para intervenções nas pregas vocais, sendo o cão (38,5%), rato/camundongo (23,1%), suíno (23,1%), coelho (19,2%), humano (11,5%) e ovino (3,8%); nenhum estudo apresentou evidências de que um modelo experimental seja melhor que os outros. Assim, a seleção do modelo experimental para estudos morfológicos deve priorizar aqueles que vocalizem, que apresentem a anatomia mais próxima dos humanos e com a maior viabilidade ética e econômica.

Os estudos de Behlau et al. (2022) mostraram que a aplicação única ou múltipla do LIV e LV, isolados ou combinados, afetam a produção da matriz extracelular pelos fibroblastos e reticulócitos e em tecidos musculares. Também, o LBP modula o sistema imunitário, tem efeito antioxidante e pode reduzir edema na mucosa e, por consequência a fadiga vocal, favorecendo a organização celular eficiente para a fonação. Diante do exposto, surge o questionamento sobre qual é o efeito da aplicação do LBP sobre os tecidos da laringe em um modelo animal, cuja laringe seja similar à laringe humana.

Espera-se que após a aplicação do LBP, haja aumento na produção de colágeno, diminuição do edema e redução de estresse oxidativo nas pregas vocais e tecidos adjacentes da laringe e, assim, orientar o estabelecimento de protocolos eficazes no tratamento das disfonias e performance vocal.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivo geral**

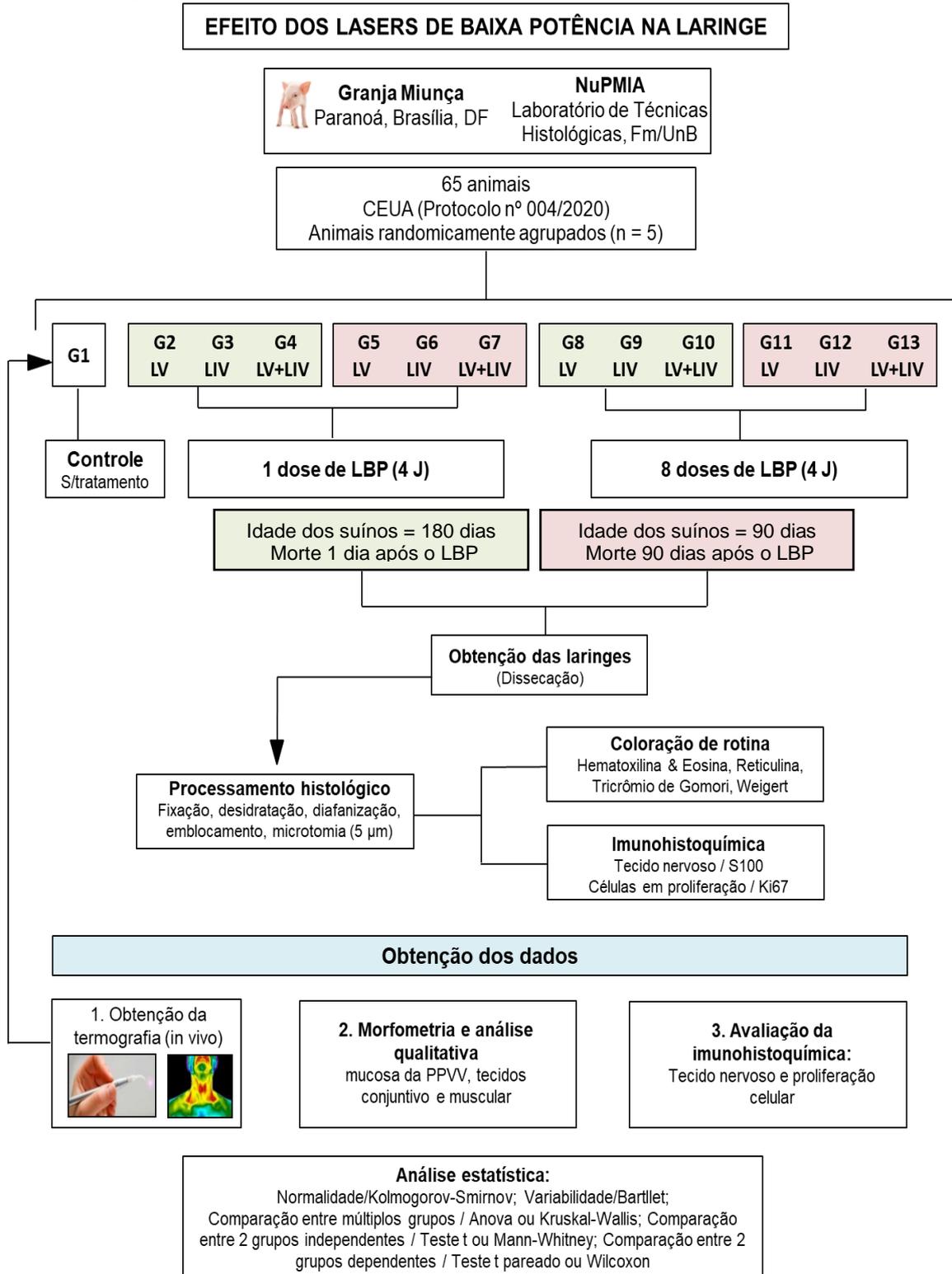
Descrever e avaliar o efeito de múltiplas aplicações do laser de baixa potência (LBP), nas faixas de luz vermelha e infravermelha, tanto isoladamente como em combinação, nos tecidos da laringe associados às pregas vocais de suínos.

## **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar a temperatura da laringe, antes e após, a aplicação do laser de baixa potência;
- Determinar a largura da mucosa;
- Quantificar os fibroblastos/fibrócitos nos tecidos conjuntivos;
- Quantificar as fibras musculares, a área das fibras e os mionúcleos do músculo tireoaritenóideo;
- Avaliar a densidade das fibras colágenas e do sistema elástico;
- Identificar e descrever os leucócitos transmigrados presentes nos tecidos analisados;
- Avaliar por imunohistoquímica a densidade das fibras nervosas (S100) e a taxa de proliferação celular (Ki67).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. Fluxograma do estudo



**Figura 1.** Fluxograma do estudo

### 3.2. Tipo de Estudo e princípios éticos

Trata-se de um estudo descritivo e comparativo, experimental pareado e não pareado, de caráter transversal e longitudinal, para avaliação dos efeitos de

dose única ou múltiplas aplicações do LBP (LV, LIV e LV+LIV), nos tecidos da laringe associados às pregas vocais de suínos.

O estudo foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) da Universidade de Brasília (UnB) e os *ensaios in vivo* foram conduzidos na Granja Miunça<sup>i</sup>, localizada na região rural de Brasília, na DF-295, km 4,5, s/n, Paranoá, Brasília/DF, 71570-000, conforme Termo de concordância (Anexo B). A granja em questão, é credenciada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo, desde 1986, referência na criação de suínos e matrizes suínas, mediante controle de qualidade semestral e bem-estar animal, além disso, a mesma é regulamentada por normas sanitárias com inspeção e fiscalização dos órgãos responsáveis.

Durante a realização deste estudo, as normas éticas para a pesquisa científica com animais de laboratório foram rigorosamente obedecidas, conforme determina a Lei nº 6.638/1979, que dispõe sobre os princípios éticos para experimentação com animais de laboratório, definidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1990) e depois de aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (CEUA/UnB), em 07 de agosto de 2020 (Protocolo nº 004/2020 – Anexo A)

Para garantir a biossegurança dos animais, dos usuários e para evitar a introdução de micro-organismos, a equipe do estudo, de acordo com o Termo de Concordância (Anexo B), foi submetida ao período de 48 horas de “vazio assistido”, em que era vedado o contato com quaisquer animais. Assim, a equipe do estudo foi hospedada em alojamento sugerido pelos responsáveis pela Granja e nas proximidades do próprio local.

### **3.3. Seleção do modelo animal, princípios éticos, critérios de inclusão e exclusão**

Considerando que os suínos são, junto com os ratos/camundongos, o segundo modelo animal mais utilizado nas pesquisas experimentais em laringologia (Fernandes *et al.*, 2022), em substituição aos cães, cujos ensaios experimentais são proibidos no Brasil (Resolução CONCEA nº 54 e 58) e que, os suínos são animais de abate, optou-se por esse modelo.

---

<sup>i</sup> Fonte: [www.hartos.com.br](http://www.hartos.com.br)

Para o estudo, optou-se por suínos de raça comercial da espécie *Sus scrofa domesticus*, machos, híbridos das raças Durok, Lage White e Landrace, com idades de 12 a 26 semanas (90 a 180 dias) e castrados quimicamente com vacina injetável, que contém uma forma modificada do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) conjugada à uma proteína, que estimula o sistema imunológico do animal a produzir anticorpos direcionados contra o GnRH (1° dose com 120 dias; 2° dose 150 dias). Os animais eram monitorados por exames de saúde e recebiam diariamente água e ração balanceada, além dos cuidados de higiene adequados e abatidos com 181 dias.

No estudo foram incluídos animais hígidos atestados por médico veterinário; foram excluídos animais que, no início ou no decorrer do estudo, apresentassem quaisquer alterações de saúde.

### 3.4. Grupos de estudo

Para o estudo, 65 animais foram randomicamente agrupados em 13 grupos (n = 5), depois de pareados por idade/peso e identificados pela aplicação de um brinco/etiqueta na orelha (brincação) (Tabela 1; figura 2A).

**Tabela 1.** Distribuição dos animais/grupos (n = 5), idade, tempo de morte e aplicação do laser de baixa potência (LBP).

Grupos	Total de doses	Idade dos animais (dias)	Tempo da morte após o LBP (dias)	Tipo do laser
1	-			Controle
2	1	180 (Adultos)	1	LV
3				LIV
4				LV+LIV
5				LV
6	90 (Jovens)	91	LIV	
7			LV+LIV	
8			LV	
9	8	180 (Adultos)	1	LIV
10				LV+LIV
11				LV
12				LIV
13				LV+LIV
		90 (Jovens)	91	

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho

Os dados foram coletados in vivo em todos os grupos (G1 ao G13), para avaliar o efeito agudo/imediato da LBP em animais jovens (90 dias) e adultos (180

dias), pelo registro da temperatura da laringe (fototermografia), imediatamente antes e logo após cada aplicação dos lasers.

O efeito tardio de 1 ou 8 doses dos LBPs foi avaliado em animais adultos, cuja intervenção ocorreu 91 dias antes da morte dos animais, enquanto que o efeito agudo ocorreu em animais adultos, cuja intervenção ocorreu entre 24 horas (dose única) ou 8 dias (8 doses) antes da morte.

Em acréscimo, os animais tratados enquanto jovens (90 dias) e mortos quando atingiram os 181 dias pertenciam aos grupos G5, G6, G7, G11, G12, G13 (efeito tardio), enquanto que os animais submetidos à LBP, quando adultos (180 dias) e mortos no dia seguinte eram dos grupos G2, G3, G4, G8, G9 e G10 (efeito agudo).

O efeito do LBP nos tecidos da laringe (histologia, histoquímica e imunohistoquímica) foram avaliados em animais adultos, depois da remoção dos blocos laríngeos e posterior processamento dos espécimes histológicos.

Para o estudo não pareado foram comparados os dados obtidos de diferentes grupos, enquanto que no estudo pareado (in vivo) foram comparados os mesmos indivíduos, antes e depois do LBP.

### **3.5. Obtenção da temperatura da laringe – Termografia**

Na primeira etapa da pesquisa, realizada entre 13 a 20 de setembro de 2021, obteve-se os dados termográficos para todos os grupos de estudo (G1 ao G13). Nesse período, as condições climáticas no bairro Paranoá, Brasília, Distrito Federal (local das instalações da Granja Miunça) /DF) eram favoráveis para a obtenção das imagens termográficas das laringes. Durante o estudo, a temperatura ambiente variou entre 15° e 28°C, sendo que, nas baias climatizadas da granja, a temperatura variou entre 19 e 23°C. A umidade do ar era de 31% e a velocidade do ar era inferior a 5 m/s (INMET, 2021).

As imagens termográficas foram captadas sempre no mesmo horário (período matutino entre 7 e 11 horas; período vespertino entre 14 e 18 horas), obedecendo a ordem dos grupos para garantir as mesmas condições climáticas da primeira coleta de temperatura, sendo a temperatura ambiente entre 18 e 25 °C, umidade do ar inferior a 50% e velocidade do ar inferior a 5 m/s, em conformidade com a recomendação da Sociedade Latino-Americana de

Termologia e Termografia em Saúde - SOLATERM (2021). A aplicação dos lasers ocorreu após a colocação de um “cachimbo” para conter e minimizar o estresse dos animais nos procedimentos de aplicação de vacinas e medicamentos (Figura 2A).

A avaliação termográfica constitui num registro de imagem não invasivo e não radioativo, cuja medição da temperatura feita com uma câmera de luz infravermelha, que permite monitorar as funções fisiológicas relacionadas com a temperatura de uma região superficial do corpo de interesse. Essa avaliação fisiológica é possível pelo aumento ou diminuição da temperatura cutânea do corpo, pela mudança de fluxo sanguíneo e outros processos termo-regulatórios, (Figura 2H). Todos os grupos experimentais foram submetidos à avaliação fototermográfica da laringe, antes e após cada aplicação dos lasers; o grupo controle (G1) foi submetido à avaliação fototermográfica antes de seguir para o abate.

O laser utilizado no estudo era irradiado a partir do equipamento Laser DMC Therapy EC® SN 20264 (DMC Equipamentos, São Carlos-SP, Brasil), (registro ANVISA: 80030819013), sendo o vermelho com comprimento de onda de 660 nm  $\pm$  10 nm semicondutor InGaAlP e o infravermelho de 808 nm  $\pm$  10 nm semicondutor AlGaAs, potência 10 mW  $\pm$  20% de potência, frequência de alimentação 56/60 Hz, tensão de saída de 5 V (2 A – corrente contínua), dimensão da peça de mão de 21 cm (altura) x 3 cm (largura) x 5 cm (profundidade), a dimensão do suporte da peça de mão de 5,9 cm (altura) x 10,4 cm (diâmetro), peso da peça de mão de 0,2 kg e 0,1 kg do suporte da peça de mão. A câmera fototermográfica era da marca FLIR, modelo E60 (fabricante FLIR Systems, E60, Wilsonville, OR, USA, distribuidor no Brasil Poliscan® Brazil Tecnologias Médicas Ltda, Campinas/SP, Brasil) com resolução térmica 320 x 240 pixels ou 76.800 pontos de medição de temperatura, sensibilidade (NETD) de 50 mK em 30 °C e precisão de  $\pm$ 2%, faixa operacional de -20°C a 650°C, campo de visão de 25° x 19° e foco manual. Essa câmera opera no espectro do infravermelho longo entre 7,5 a 13  $\mu$ m e permite a visualização da radiação de uma pessoa, animal ou objeto, a qual foi cedida pelo representante do fabricante no Brasil Poliscan® (Campinas, São Paulo, Brasil) (Figura 2C).

A irradiação dos LBPs se deu em três pontos sequenciais da laringe (1/3 médio da prega vocal, proeminência laríngea direita e 1/3 médio da prega vocal esquerda), mediante contato pontual e sob leve pressão, com ângulo de 90°, na

dose de 4 J por 40 segundos, totalizando o tempo de manuseio/animal em ~120 segundos; as aplicações eram realizadas pelo mesmo pesquisador, com o auxílio de dois técnicos responsáveis pelos animais (Figura 2 D, E, F).

As temperaturas foram tomadas a partir da média dos três pontos de aplicação do LBP. As configurações para as medições foram a temperatura máxima de 35,2 °C; temperatura mínima de 25,2 °C; emissividade de 0,95 e temperatura refletida 23 °C (Figura 2G, H). As imagens foram capturadas a uma distância de 1,5 m entre câmera/pesquisadora e os animais (Figura 2B). Depois de coletadas e tabuladas, as análises foram feitas por um único avaliador por meio do Software Flir Tools® (fabricante FLIR Systems, E60, Wilsonville, OR, USA).

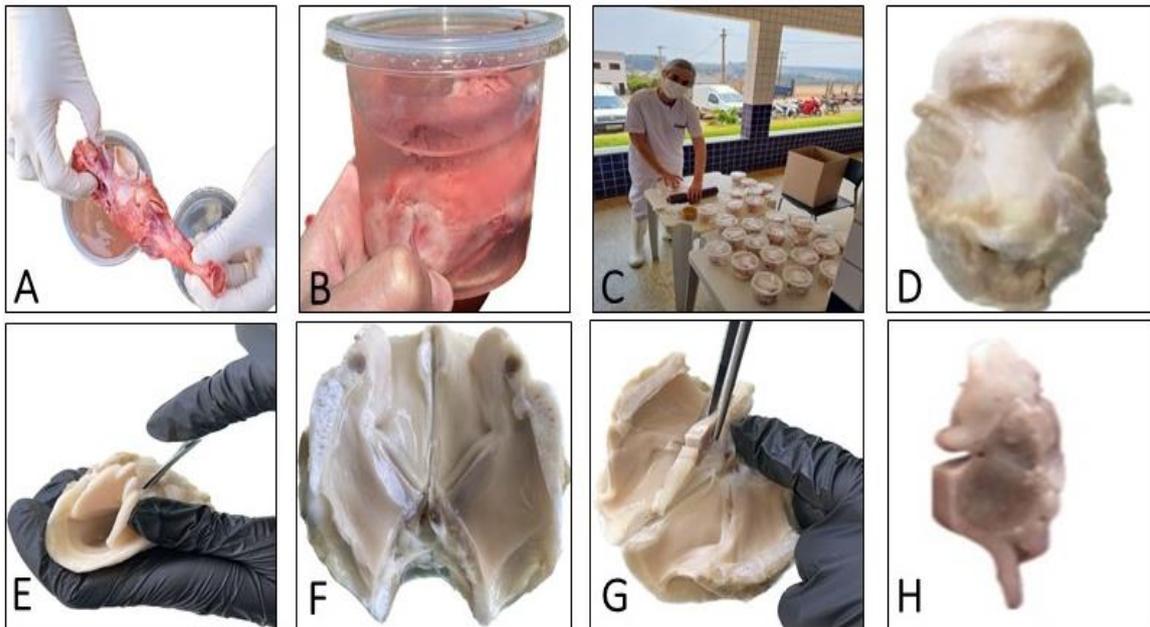


**Figura 2.** Marcação e identificação dos animais – brincadeira (A); contenção do animal – cachimbo (A); medição da distância para a tiragem da fotografia (1,5m) (B), posicionamento entre a pesquisadora e o animal (C); aplicação do LBP no 1/3 médio da prega vocal direita (D); aplicação do LBP na proeminência laríngea (E); aplicação do LBP na prega vocal esquerda (F); marcação dos três pontos laríngeos no programa para o registro das médias das temperaturas (G), foram feitos registros de fototermografia, antes e após cada aplicação dos lasers, pontos de aplicação do LBP (H).

### **3.6. Obtenção dos blocos laríngeos e dos espécimes histológicos**

O abate/morte dos suínos foi conduzido no Frigorífico Frimelo, Setor Industrial, Luziânia/GO, conforme normas e procedimentos recomendados pelos órgãos oficiais do Brasil (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Assim, os animais foram submetidos a um banho de água limpa e resfriada, por 3 minutos, para fins de higienização, visando promover vasoconstrição e aumentar a eficiência da insensibilização. Depois, os animais eram submetidos a uma descarga elétrica (voltagem média entre 250 a 600 V) para provocar a perda da consciência e dos sinais vitais. Em seguida, os animais eram degolados, lavados, submetidos à escalda com vapor e/ou imersão em água quente (~62 °C) para antissepsia. Depois de depilados, chamuscados, lavados em água quente sob pressão, os animais eram eviscerados para a coleta e inserção do carimbo de inspeção das estruturas e órgãos de interesse comercial.

Considerados como descarte, os blocos laríngeos coletados (~5 cm de diâmetro) eram identificados e fixados em paraformaldeído (5%) (Figura 3A). Então, os blocos eram dissecados para delimitar a laringe/pregas vocais e mantidos em fixador nos frascos (Figura 3 C, D) até o processamento histológico (~2 dias). Em seguida, os espécimes histológicos eram desidratados em soluções com concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 3x 100%), diafanizados em xilol por 30 minutos (2 banhos), impregnados e emblocados em parafina a 60 °C (3 banhos). Posteriormente, os espécimes eram submetidos à microtomia (5 µm de espessura) (Figura 3 D, E, F, G, H) e às colorações de rotina (H&E, Gomori, Reticulina e Weigert) e imunohistoquímica (Ki67 e S100).



**Figura 3.** Bloco laríngeo retirado no abatedouro da região laríngea (A); peças anatômicas nos frascos contendo fixador (B); acondicionamento e armazenamento (C); bloco laríngeo dissecado (D); corte sagital/mediano para identificar/localizar ras pregas vocais (E); separação e identificação das duas hemilaringes (F); remoção do 1/3 médio da prega vocal direita para o estudo (G); vista lateral exibindo a mucosa e o tecido muscular (H).

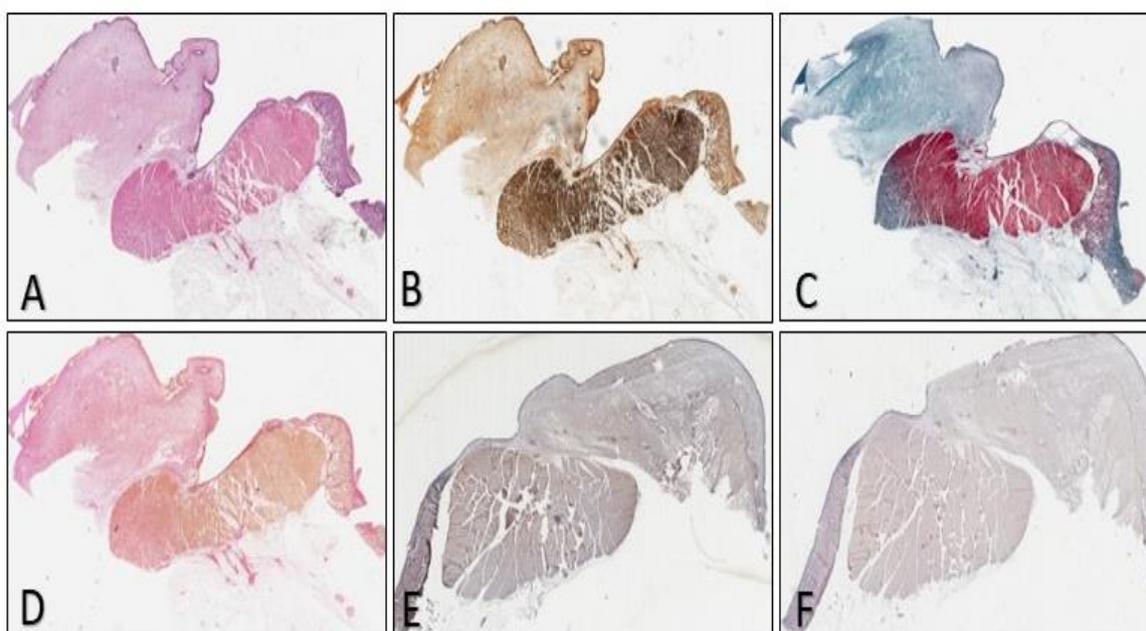
### 3.7. Obtenção das imagens histológicas

Para o estudo dos tecidos, as secções histológicas foram submetidas ao protocolo padrão para os métodos de coloração: 1) para avaliar as células fixas e migratórias do tecido conjuntivo utilizou-se a hematoxilina e eosina; 2) para avaliar a matriz extracelular do tecido conjuntivo (colágeno I, azul) e as fibras musculares em vermelho utilizou-se o tricrômio de Gomori; 3) para identificar as fibras do sistema elástico utilizou-se o método de Weigert; 4) para as fibras reticulares utilizou-se o método da reticulina (colágeno III, preto).

Para avaliar as fibras nervosas e as células em proliferação foi realizada a análise imuno-histoquímica com os anticorpos monoclonais S100 (tecido nervoso) e ki67 (células em mitose). Considerando que a parafinização dos espécimes mascara os sítios antigênicos das células, a recuperação antigênica se deu pela imersão das lâminas em cuba vaporizada contendo tampão citrato com 0,2% de Tween 20 a 95 °C. Depois de resfriadas, as lâminas foram lavadas em água destilada, submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena pela imersão em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 10% por 15 minutos (2x), lavadas (3x) em água destilada e lavadas com tampão TBS (TRIS pH 7,3 e cloreto de

sódio em água destilada + Tween 20). Na sequência, adicionou-se às secções histológicas 50 µL de anticorpo primário monoclonal S100 ou Ki67 (clone: QBEnd/10, Biocare Medical, Concord-CA, United States), diluído na proporção de 1:100 em tampão TBS com 1% de SAB. Depois da incubação por 24 horas a 4 °C, as lâminas foram lavadas (TBS/Tween 20), reincubadas com 50 µL de anticorpo secundário biotilado anti-cabra (Spring®, Pleasanton, United States) diluído em 1:200 em tampão TBS/Tween 20, por 1h e lavadas com TBS/Tween 20. Para visualizar os imunocomplexos, as secções histológicas foram incubadas com solução de estreptavidina-peroxidase (Spring®, Pleasanton, United States) em TBS por 30 minutos à temperatura ambiente e em seguida com solução de diaminobenzidina (DMB) e peróxido de hidrogênio por 10 mais minutos. Depois de lavadas 3x em água corrente, as secções histológicas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, novamente lavadas em água corrente por 5 minutos e finalmente protegidas com lamínulas aderidas com resina sintética (Enthelan®, Sigma-Aldrich).

Depois de coradas, as imagens das secções histológicas foram capturadas com ampliação de 200x no equipamento Aperio Scan Scope® e avaliadas no programa Image Scope version 11.2.0.780 (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA) por um único observador (Figura 4).

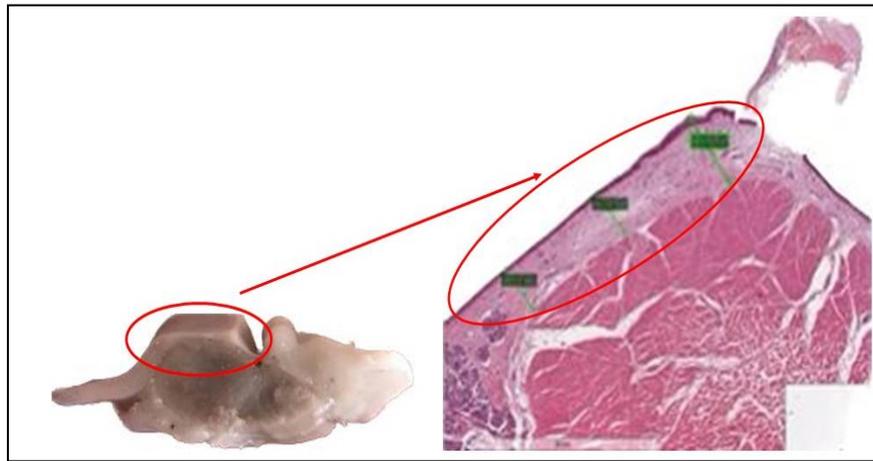


**Figura 4.** Fotomicrografias das laringes/pregas vocais, representativas para exemplificar os métodos de coloração, hematoxilina & e eosina (A), reticulina (B), tricômico de Gomori (C), Weigert (D) e imunohistoquímica para as proteínas S100 e ki67 (E e F).

### 3.8. Obtenção dos dados morfométricos

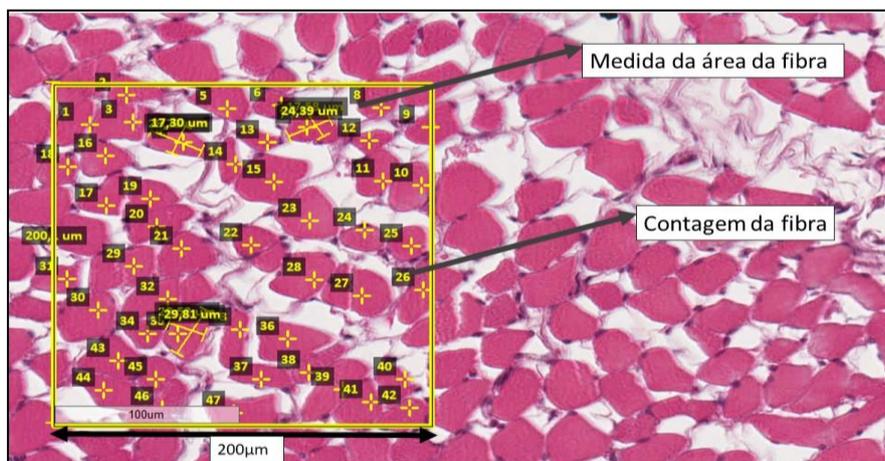
A coleta dos dados semiquantitativos relativos aos tecidos da laringe ocorreu por um único observador no software de análise do Image Scope version, conforme descrito abaixo:

**A.** Largura da mucosa – foram marcados 3 pontos equidistantes na mucosa do 1/3 médio da prega vocal (verdadeira) direita (medida em mm) (Figura 5);



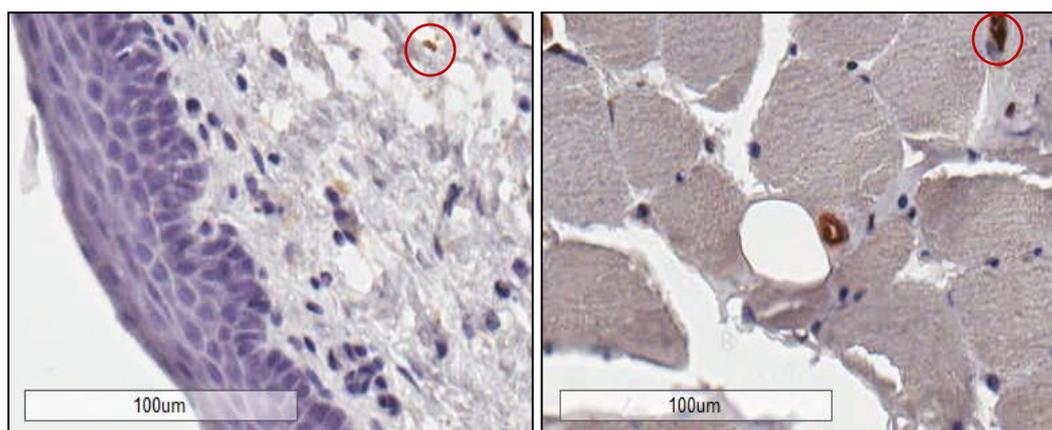
**Figura 5.** Fotografia exemplificando a região selecionada para determinar a largura da mucosa, pela marcação dos 3 pontos equidistantes nas secções histológicas.

**B.** Para a quantificação dos fibroblastos/fibrócitos nos tecidos conjuntivos, fibras musculares e mionúcleos delimitou-se 4 quadrantes equidistantes de 40.000  $\mu\text{m}^2$  (200  $\mu\text{m}$  x 200  $\mu\text{m}$ ) (Figura 6);



**Figura 6.** Secção histológica do músculo laríngeo (1/3 médio da prega vocal) exemplificando como a área (200  $\mu\text{m}^2$ ) foi delimitada para quantificar o n° de fibras musculares e os diâmetros (maior e menor) para estimar a área das fibras. Coloração H&E.

- C. Para estimar a área das fibras musculares foram selecionadas 3 fibras por quadrante ( $40.000 \mu\text{m}^2$ ) e tomadas as medidas dos diâmetros, maior e menor, de cada fibra, totalizando 12 fibras por imagem/animal;
- D. Para os diferentes tecidos (epitelial, conjuntivo e muscular) foram analisados diferentes aspectos quando presentes ou ausentes e depois descritos qualitativamente. Para o tecido epitelial avaliou-se o espessamento, ulceração, necrose e microabscessos, para o tecido conjuntivo avaliou-se o edema, infiltrado inflamatório, hemorragia, degeneração celular e fibrose e, para o tecido muscular, considerou-se a justaposição celular, fibrose e infiltrado inflamatório.
- E. Para as secções histológicas submetidas à imunohistoquímica, S100 (fibras nervosas) ou Ki67 (células em mitose), as células/fibras marcadas em cor castanha foram quantificadas equivalente a  $160.000 \mu\text{m}^2$  ( $400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$ ), sendo os resultados foram expressos em total de imunomarcações/ $4 \text{ mm}^2/\text{animal}$  (Figura 7).



**Figura 7.** Exemplo de secção histológica submetida à imunohistoquímica para identificar as fibras nervosas (S100, esquerda) e células em mitose (Ki67, direita). A quantificação foi feita numa área de  $400 \mu\text{m}^2$ .

No ensaio experimental houve a perda de 2 animais do grupo G11, resultando no  $n = 3$  e durante o processamento histológico para houve a perda de alguns espécimes histológicos, sobretudo para a imunohistoquímica. A tabela 2 mostra o número exato de amostras/animal/grupo analisadas na coleta dos resultados.

**Tabela 2.** Quantidade (n) final de animais/amostras/lâminas por grupo após tratamento utilizado nas análises conforme análise termográfica e método imunohistoquímico.

Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Tratamento	-	LV	LIV	LV+LIV											
Termografia	5	5	5		5				5		5	5			
Hematoxilina & eosina	4		4								3				
Weigert															
Reticulina															
Tricrômio de Gomori															
S100														4	2
Ki67														5	3

LV: Luz Vermelha; LIV: Luz Infravermelha.

### 3.9. Análise Estatística

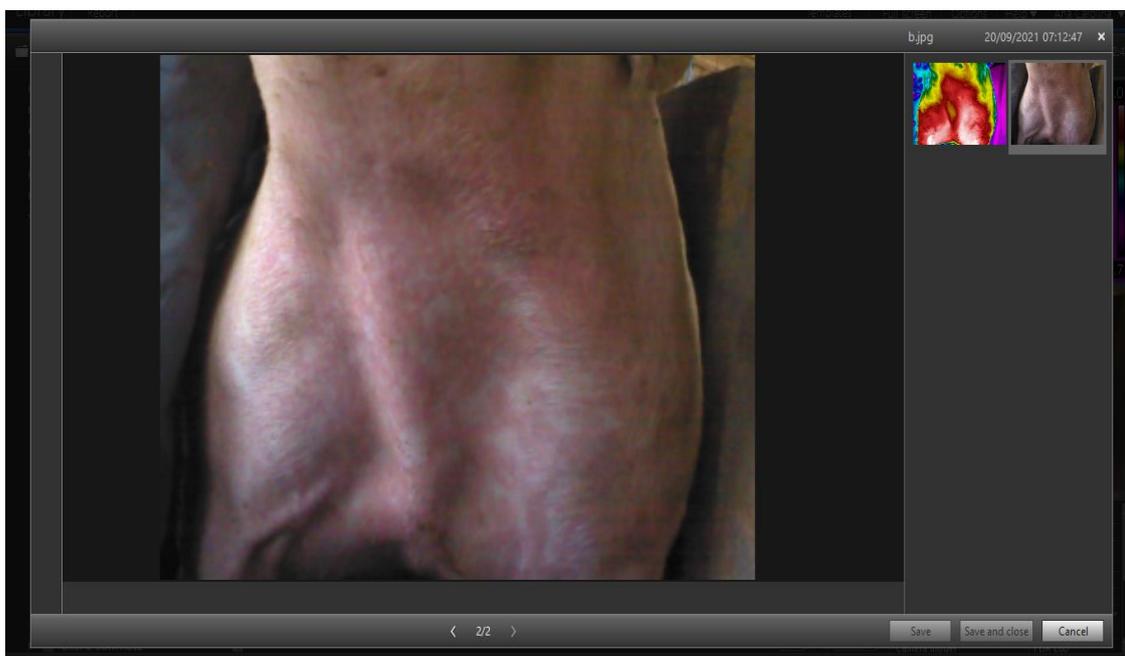
Para a análise dos dados foram avaliadas a normalidade (N) pelo teste Kolmogorov-Smirnoff e a variabilidade (V) das variáveis pelo teste de Bartlett. Para comparar mais de dois grupos foram utilizados os testes ANOVA (pós teste, Student-Newman-Keuls) (N,  $p > 0,05$ ) ou Kruskal-Wallis (pós teste, Dunn) (N e/ou V,  $p < 0,05$ ) e para comparar dois grupos independentes utilizou-se os testes t-Student (N,  $p > 0,05$ ) ou Mann-Whitney (N e/ou V,  $p < 0,05$ ). Para comparar duas amostras dependentes foram utilizados os testes t-pareado (N,  $p > 0,05$ ), Wilcoxon (N e/ou V,  $p < 0,05$ ). As diferenças entre as variáveis foram consideradas significativas quando a probabilidade bicaudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) for menor que 5% ( $p < 0,05$ ). As análises e as representações gráficas dos resultados foram feitas pelo programa Prism 5.0®.

#### **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Observações clínicas durante e após a aplicação dos LBPs

Durante a aplicação do LBP, foram observadas algumas reações adversas na pele dos suínos.

Sinais clínicos como eritema e vermelhidão foram observados no corpo de um animal adulto submetido a 8 doses do LV, imediatamente depois das duas primeiras doses, no entanto, esses sintomas desapareceram a partir da terceira dose. Ainda, outros dois animais apresentaram eritema apenas na segunda dose. Similarmente, o eritema foi observado em um animal jovem na primeira dose do LV e um outro apresentou vermelhidão, também na primeira dose do LIV.



**Figura 8.** Fotografia com exemplo de um animal com eritema e vermelhidão após aplicação do LBP (luz vermelha).

#### 4.2. Efeito do laser de baixa potência na temperatura da laringe de suínos

Os dados capturados a partir das imagens termográficas para avaliar o efeito agudo de 1 ou 8 doses do laser de baixa potência (LBP) na temperatura da laringe de suínos jovens e adultos de todos os 65 animais (G1 a G13; n = 5) selecionados para essa pesquisa estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

#### 4.2.1. Efeito agudo da aplicação de 1 dose do LBP na temperatura da laringe de suínos jovens (90 dias) e adultos (180 dias)

Os resultados do efeito agudo da aplicação de 1 dose do LBP na temperatura da laringe de suínos jovens e adultos estão apresentados na tabela 3 e figura 9.

Para os animais adultos, os resultados mostraram que, quando comparada a temperatura antes e após a aplicação do laser, tendo os próprios animais como controle deles mesmos ( $n = 15$ ), não houve diferença entre as temperaturas com os diferentes lasers LV, LIV ou LV+LIV ( $n = 5$ ) (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

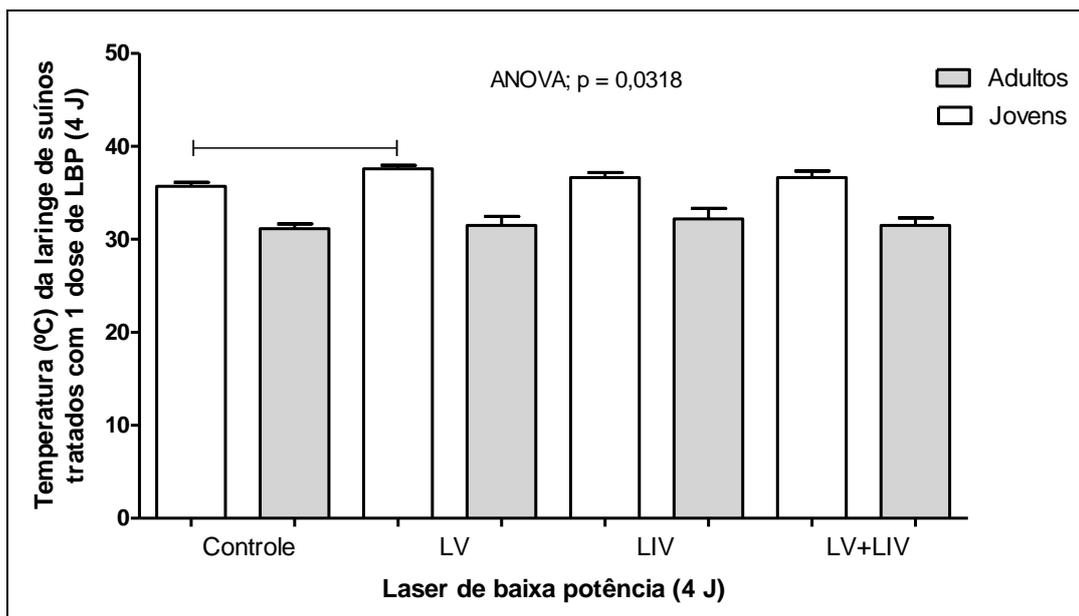
Diferentemente dos adultos, o grupo de jovens, tratado com dose única do LV ( $n = 5$ ) aumentou a temperatura para  $37,6 \pm 0,8$  °C, quando comparada com a temperatura antes da aplicação ( $35,7 \pm 1,7$  °C), (ANOVA + Student-Newman-Keuls;  $p = 0,0318$ ); os demais lasers (LIV ou LV+LIV) não diferiram do controle, assim como, não houve diferenças entre os diferentes lasers ( $p > 0,05$ ).

Também, os resultados mostraram que os animais jovens não submetidos ao LBP apresentavam temperatura 12% maior ( $35,7 \pm 1,7$  °C) do que os animais adultos não submetidos ao LBP ( $31,2 \pm 1,9$ ) (Figura 10).

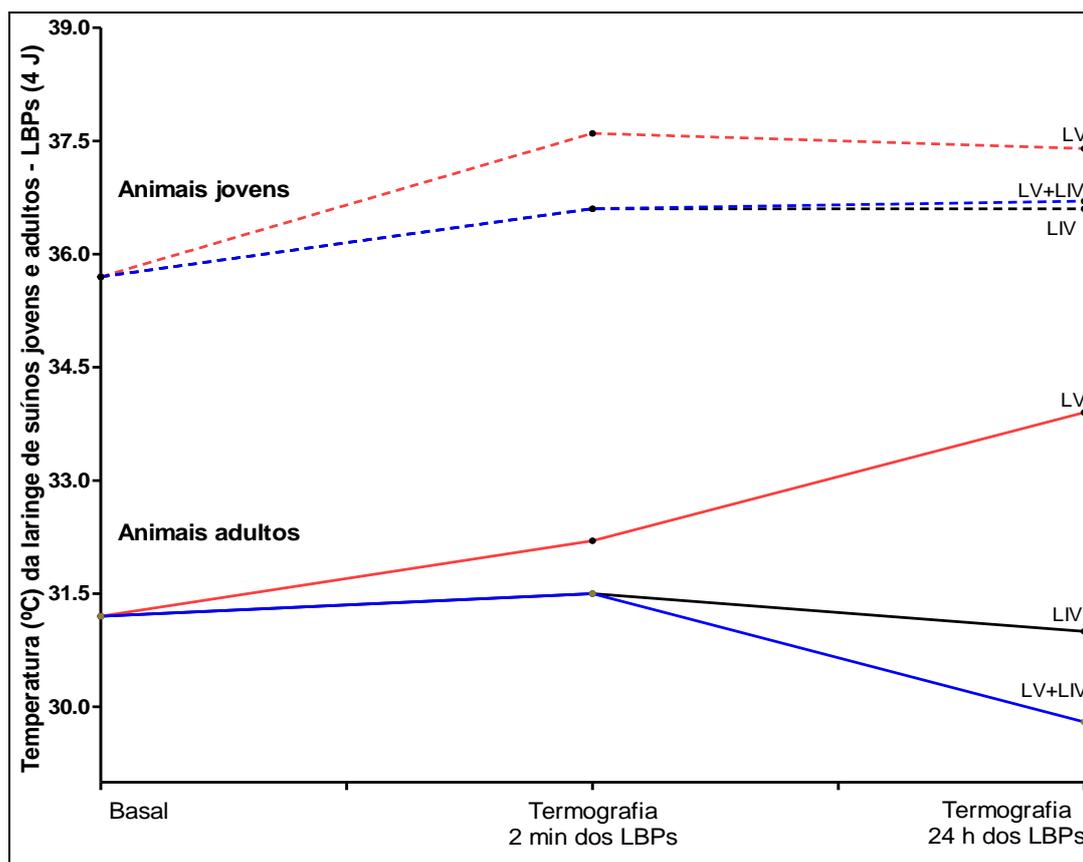
**Tabela 3.** Efeito agudo de dose única na temperatura da laringe de suínos adultos e jovens, antes e depois da LBP.

Grupos	Idade dos animais	Sem LBP	Com LBP	ANOVA; valor de p
		Temperatura °C		
LV	Jovens (90 dias)	35,7 ± 1,7	37,6 ± 0,8	= 0,0318
LIV			36,6 ± 1,1	
LV+LIV			36,6 ± 1,5	
LV	Adultos (180 dias)	31,2±1,9	31,5 ± 2,2	> 0,05
LIV			32,2 ± 2,5	
LV+LIV			31,5 ± 1,8	

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho. Os pares com diferenças estatísticas estão destacados em cinza.



**Figura 9.** O efeito agudo na temperatura da laringe após aplicação de 1 dose do LBP (LV, LIV o LV+LIV), em animais jovens e adultos tratados (n = 5) ou não tratados (n = 15). Os resultados mostraram que, comparado ao controle, o LV aumentou a temperatura dos animais jovens (ANOVA; p = 0,0318); os demais grupos não diferiram entre si, assim como não houve diferenças entre os grupos dos animais adultos (ANOVA; p > 0,05). Estão representados as médias e os desvios padrão.



**Figura 10.** Temperatura basal dos animais jovens e adultos, 2 minutos e 24 horas após a aplicação dos LBPs. Estão representadas as médias dos três dados termográficos.

#### **4.2.2 Efeito agudo da aplicação de 8 doses do laser de baixa potência na temperatura da laringe de suínos jovens (90 dias) e adultos (180) dias**

Os resultados do efeito agudo do LBP (LV, LIV, LV+LIV), sendo 8 doses diárias na temperatura da laringe de suínos jovens e adultos estão apresentados na tabela 3, 4 e figuras 11, 12.

##### **A. Animais jovens**

Os resultados mostraram significativa variação na média±DP da temperatura antes da aplicação do LBP nos animais jovens, sendo a maior observada no segundo dia e a menor no sexto dia (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p = 0,009$ ). Semelhantemente, depois da aplicação do LV houve variação na mediana da temperatura, sendo a maior temperatura delas observada no segundo dia e a menor observada do sexto ao oitavo dia (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p = 0,005$ ).

Para o LIV não houve diferença entre a maior observada ao 8º dia ( $37,9 \pm 0,9$  °C) e a menor ao 6º dia ( $33,9 \pm 3,0$  °C) (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p > 0,05$ ). Posteriormente à aplicação do LIV, a temperatura da laringe foi de mínima 35,0 °C na 6ª dose para máxima 37,9 °C na 8ª dose, mas não houve diferença entre as temperaturas (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p > 0,05$ ).

Os resultados mostraram que a combinação dos lasers (LV+LIV) aumentou a temperatura da laringe porque esta variou de  $36,0 \pm 0,8$  °C (mínima  $34,6 \pm 1,8$  °C na 5ª dose; máxima  $37,0 \pm 1,1$  °C na 8ª dose), para  $37,1 \pm 0,8$  °C (mínima  $35,9$  °C/5º dose; máxima  $37,8$  °C/8º dose).

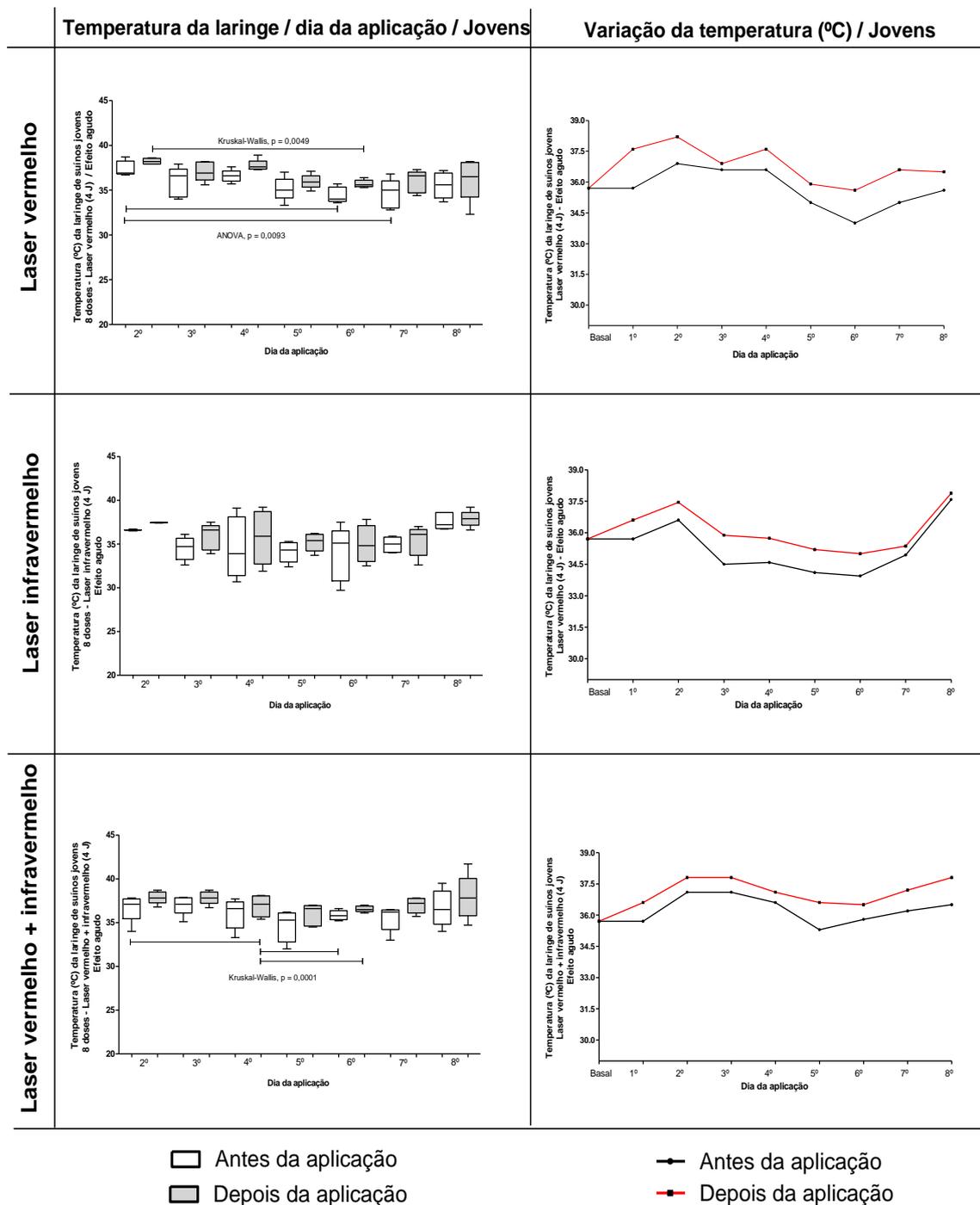
Nas análises individuais dos grupos, os resultados mostraram variação significativa na temperatura da laringe, durante os 8 dias do ensaio, para os animais de todos os grupos, antes da intervenção (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p = 0,009$ ), e depois das múltiplas doses do LV (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p = 0,005$ ). Os demais grupos (LIV e LV+LIV) não apresentaram variação de temperatura durante os 8 dias de intervenção ( $p > 0,05$ ).

Os resultados mostraram que o LV, LIV e LV+LIV aumentaram a temperatura da laringe dos animais jovens em 2,8% ( $35,7 \pm 1,9$  °C para  $36,7 \pm 1,0$  °C), 2,4% ( $35,2 \pm 1,4$  para  $36,1 \pm 1,1$  °C) e 3,1% ( $36,0 \pm 0,8$  para  $37,1 \pm 0,8$  °C), respectivamente (Teste t pareado;  $p < 0,0001$ ).

**Tabela 4.** Efeito agudo de 8 doses do LBP na temperatura da laringe de porcos jovens (90 dias), avaliada antes e imediatamente após a intervenção.

Grupos →	LV	LIV	LV+LIV	LV	LIV	LV+LIV
<b>Dia da LBP</b>	<i>Temperatura antes do LBP (°C)</i>			<i>Temperatura depois do LBP (°C)</i>		
<b>D0</b>	35,7±1,7			35,7±1,7		
<b>D1</b>				37,6±0,8	36,6±1,1	36,6±1,5
<b>D2</b>	37,4±0,8 <sup>oo</sup>	36,6±0,1	36,7±1,5	38,2±0,3	37,5±0,1	37,9±0,7
	36,9	36,6	37,1	38,2 <sup>o</sup>	37,5	37,8
<b>D3</b>	36,0±1,6	34,5±1,3	37,0±1,1	37,1±1,1	35,9±1,5	37,8±0,8
	36,6	34,7	37,1	36,6	36,6	37,8
<b>D4</b>	36,6±0,7	34,6±3,5	36,0±1,7	37,7±0,7	35,7±3,1	36,9±1,2
	36,6	33,9	36,6	37,6	35,9	37,1
<b>D5</b>	35,1±1,3	34,1±1,2	34,6±1,8	36,0±0,8	35,2±1,0	35,9±1,2
	35,0	34,3	35,3	35,9	35,4	36,6
<b>D6</b>	34,4±0,9 <sup>o</sup>	33,9±3,1	35,8±0,5	35,7±0,4	35,0±2,1	36,6±0,4
	34,0	35,1	35,8	35,6 <sup>o</sup>	34,8	36,5
<b>D7</b>	34,6±1,6 <sup>o</sup>	34,9±0,9	35,5±1,5	36,0±1,2	35,4±1,7	37,0±0,9
	35,0	35,0	36,2	35,6	36,1	37,2
<b>D8</b>	35,5±1,4	37,6±0,9	36,7±2,1	36,2±2,4	37,9±0,9	37,9±2,5
	35,6	37,2	36,5	36,5	37,9	37,8
<b>Mean ± SD</b>	<b>35,7±1,9*</b>	<b>35,2±1,4*</b>	<b>36,0±0,8*</b>	<b>36,7±1,0*</b>	<b>36,1±1,1*</b>	<b>37,1±0,8*</b>
	<b>35,5</b>	<b>34,6</b>	<b>36,0</b>	<b>36,2</b>	<b>35,7</b>	<b>37,0</b>
<b>Análise estatística</b>	<b>AN+SNK</b>	<b>AN+SNK</b>	<b>AN+SNK</b>	<b>KW+D</b>	<b>AN+SNK</b>	<b>KW+D</b>
<b>p value</b>	<b>p = 0,0093</b>	<b>p &gt; 0,05</b>	<b>p &gt; 0,05</b>	<b>p = 0,0049</b>	<b>p &gt; 0,05</b>	<b>p &gt; 0,05</b>

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho; AN+SNK: ANOVA+Student-Newman-Keuls; KW+D: Kruskal-Wallis+Dunn; o símbolo (°) em cores indica os valores com diferença nas análises multivariadas (AN+SNK ou KW+D); os (\*) coloridos indicam os valores diferentes nas análises pareadas (Teste t pareado).



**Figura 11.** O efeito agudo na temperatura da laringe após aplicação de 8 doses do LBP (LV, LIV o LV+LIV), em animais jovens. Os resultados mostraram variação da temperatura (aumento e redução), antes (ANOVA,  $p = 0,0093$ ) e após a aplicação do LV (KW,  $p < 0,001$ ); as 8 doses do LIV ou LV+LIV não afetaram a temperatura, antes ou depois ( $p > 0,05$ ). Os LBPS LV, LIV e LV+LIV aumentaram a temperatura da laringe dos animais jovens em 2,8%, 2,4% e 3,1%, respectivamente (Teste t pareado;  $p < 0,0001$ ). Estão representadas as medianas, médias e os desvios padrão.

## **B. Animais adultos**

Os resultados do LBP na temperatura da laringe dos animais adultos são mostrados na tabela 5 e figura 12.

### **B1. Laser vermelho**

Antes da aplicação do LV a temperatura da laringe foi de  $32,1 \pm 1,7$  °C, sendo que houve diferença entre a maior observada ao 3º dia ( $34,5 \pm 1,2$  °C) e a menor ao 7º dia ( $30,0 \pm 1,8$  °C) (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p = 0,0029$ ), Posteriormente à aplicação do LV, a temperatura média da laringe foi de  $32,3 \pm 1,5$  °C (mínima  $31,2 \pm 2,3$  °C na 6ª dose; máxima  $34,3 \pm 1,1$  °C na 3ª dose); não houve diferença entre as temperaturas (ANOVA,  $p > 0,05$ ). No conjunto, a temperatura da laringe não diferiu ao longo das 7 doses nos suínos adultos não (Teste t pareado,  $p > 0,05$ ).

### **B2. Laser infravermelho**

Antes da aplicação, a temperatura média foi de  $32,9 \pm 1,5$  °C, sendo a maior observada ao 3º dia ( $34,7 \pm 3,0$  °C) e a menor ao 7º dia ( $30,7 \pm 2,0$  °C); não houve diferença entre as temperaturas da laringe (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p > 0,05$ ). Posteriormente ao LIV, a temperatura foi de  $33,6 \pm 1,2$  °C, sendo que, a maior ocorreu ao 3º dia ( $35,1 \pm 3,2$  °C) e a menor foi observada com a 6ª dose ( $31,7 \pm 3,2$  °C); não houve diferença entre as temperaturas (Kruskall-Wallis + Dunn,  $p > 0,05$ ). No conjunto, a análise pareada mostrou que as 7 doses do LIV aumentaram a temperatura da laringe do grupo de adultos em 2,1% (Teste t pareado,  $p = 0,0208$ ).

### **B3. Laser vermelho+infravermelho**

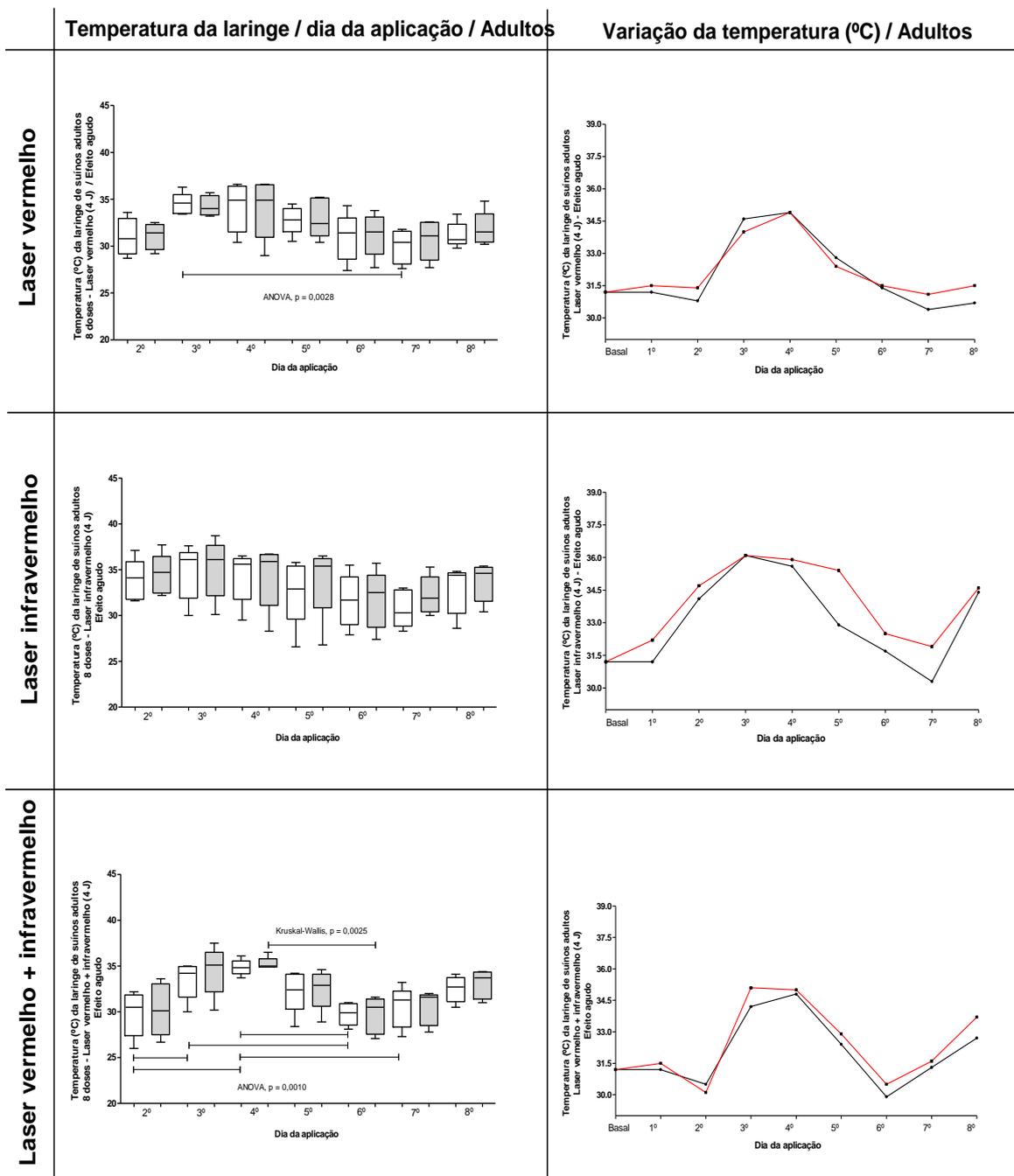
Os resultados mostraram que a combinação dos lasers (LV+LIV) aumentou a temperatura da laringe no grupo de animais adultos em 0,9% (Teste t pareado,  $p = 0,0355$ ). Isso ocorreu porque a temperatura da laringe passou de  $31,9 \pm 1,9$  °C (mínima  $29,7 \pm 1,2$  °C na 6ª dose; máxima  $34,8 \pm 0,9$  °C na 4ª dose), para  $32,2 \pm 2,2$  °C mínima  $30,2 \pm 2,9$  °C/2º dose; máxima  $35,3 \pm 0,7$  °C/4º dose). Houve

diferença entre as temperaturas, anteriormente (ANOVA,  $p = 0,0010$ ) e, posteriormente ao LBP combinada (Kruskal-Wallis,  $p = 0,0025$ ).

**Tabela 5.** Efeito agudo de 8 doses do laser de baixa potência na temperatura da laringe de porcos adultos (180 dias), avaliada antes e imediatamente após a intervenção.

Grupos →	LV	LIV	LV+LIV	LV	LIV	LV+LIV
Dia da LBP	Temperatura antes do LBP (°C)			Temperatura depois do LBP (°C)		
D0	31,2±1,9			31,2±1,9		
D1				31,5±2,2	32,2±2,5	31,5±1,8
D2	31,0±2,0 30,8	33,9±2,2 34,1	29,8±2,5** 30,5	31,1±1,4 31,4	34,5±2,2 34,7	30,2±2,9 30,1
D3	34,5±1,2* 34,6	34,7±3,0 36,1	33,5±2,1** 34,2	34,3±1,1 34,0	35,1±3,2 36,1	34,5±2,7 35,1
D4	34,1±2,6* 34,9	34,3±2,8 35,6	34,8±0,9** 34,8	34,0±3,2 34,9	34,3±3,5 35,9	35,3±0,7* 35,0
D5	32,8±1,5 32,8	32,6±3,6 32,9	32,2±2,3 32,4	33,0±2,1 32,4	33,9±4,0 35,4	32,5±2,2 32,9
D6	30,9±2,5 31,4	31,6±2,9 31,7	29,7±1,2** 29,9	31,2±2,3 31,5	31,7±3,2 32,5	29,7±2,0* 30,5
D7	30,0±1,8** 30,4	30,7±2,0 30,3	30,5±2,2* 31,1	30,6±2,1 31,1	32,2±2,1 31,9	30,5±1,9 31,6
D8	31,2±1,4 30,7	32,8±2,6 34,4	32,5±1,4 32,7	31,9±1,8 31,5	33,6±2,1 34,6	33,0±1,5 33,7
<b>Média ± DP</b>	<b>32,1±1,7</b> <b>31,2</b>	<b>32,9±1,5<sup>o</sup></b> <b>32,8</b>	<b>31,9±1,9<sup>o</sup></b> <b>32,2</b>	<b>32,3±1,5</b> <b>31,9</b>	<b>33,6±1,2<sup>o</sup></b> <b>33,9</b>	<b>32,2±2,2<sup>o</sup></b> <b>32,5</b>
<b>Teste estatístico</b>	<b>AN+SNK</b>	<b>AN+SNK;</b>	<b>AN+SNK;</b>	<b>AN+SNK</b>	<b>AN+SNK;</b>	<b>KW+D</b>
<b>p value</b>	<b>p = 0,0045</b>	<b>p = 0,05</b>	<b>p = 0,0010</b>	<b>p &gt; 0,05</b>	<b>p &gt; 0,05</b>	<b>p = 0,0025</b>

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho; AN+SNK: ANOVA+Student-Newman-Keuls; KW+D: Kruskal-Wallis+Dunn; os (\*) em cores indica os valores diferentes nas análises multivariadas (AN+SNK ou KW+D); o símbolo (°) em cores indicam os pares de resultados diferentes nas análises pareadas (Teste t pareado).



Antes da aplicação  
 Depois da aplicação

Antes da aplicação  
 Depois da aplicação

**Figura 12.** O efeito agudo de 8 doses do LBP na temperatura da laringe em animais adultos. Os resultados mostraram que antes da aplicação, LV, LIV e LV+LIV causaram variação na temperatura (aumento e redução) (ANOVA,  $p < 0,05$ ), após a aplicação, essa variação foi observada apenas com LV+LIV (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). As análises pareadas mostraram que LIV e LV+LIV aumentaram a temperatura da laringe em 2,1% e 0,9%, respectivamente (Teste t pareado,  $p < 0,05$ ). Estão representadas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos, e pontos extremos (esquerda); as médias  $\pm$  desvios padrão estão representadas na cinética da temperatura (direita).

### 4.3. Efeito dos LBPs nos tecidos da laringe de animais adultos

Foram analisados os efeitos agudo e tardio após a aplicação do LBP do LV, LIV e LIV+V nos suínos adultos (181 dias), cuja intervenção ocorreu 90 dias (efeito tardio) ou 1 dia (efeito agudo) antes da morte.

#### 4.3.1. Largura da mucosa associada à prega vocal

Os efeitos, agudo ou tardio, da aplicação dos LBPs na largura da mucosa associada à prega vocal são mostrados na tabela 6 e figuras 13 e 14.

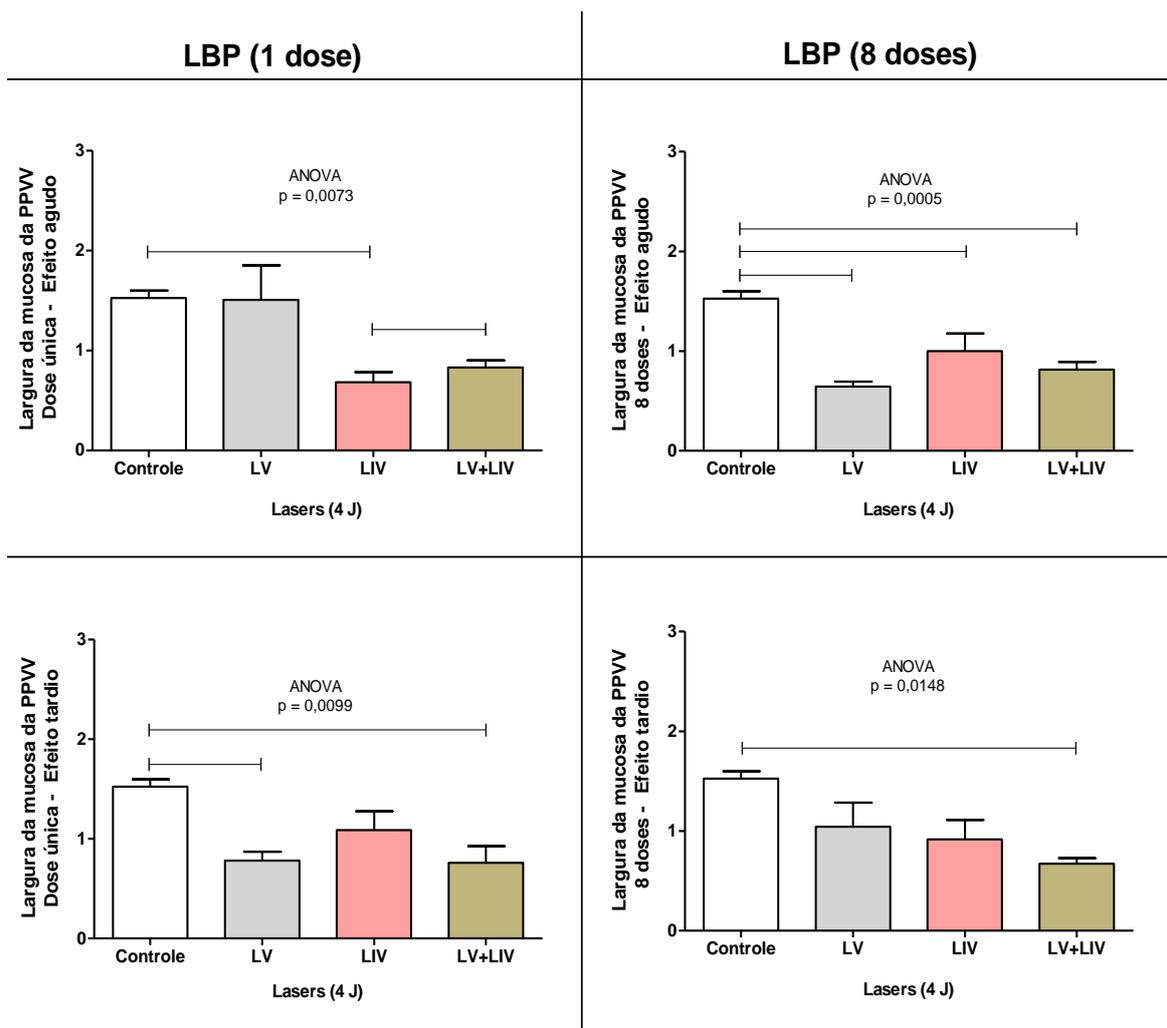
Os resultados mostraram de forma aguda ou tardia que, comparado ao controle, 1 dose do LIV diminuiu a largura da mucosa (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p < 0,001$ ). Também, LV+LIV diminuiu a largura da mucosa quando comparado ao LV (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p < 0,001$ ), mas não ao grupo controle.

Tardiamente, 1 ou 8 doses do LV+LIV reduziram a largura da mucosa quando comparado ao controle (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p < 0,001$ ). De forma aguda, 8 doses dos LBPs (LV, LIV, LV+LIV) reduziram a mucosa, quando comparado ao controle (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p < 0,001$ ).

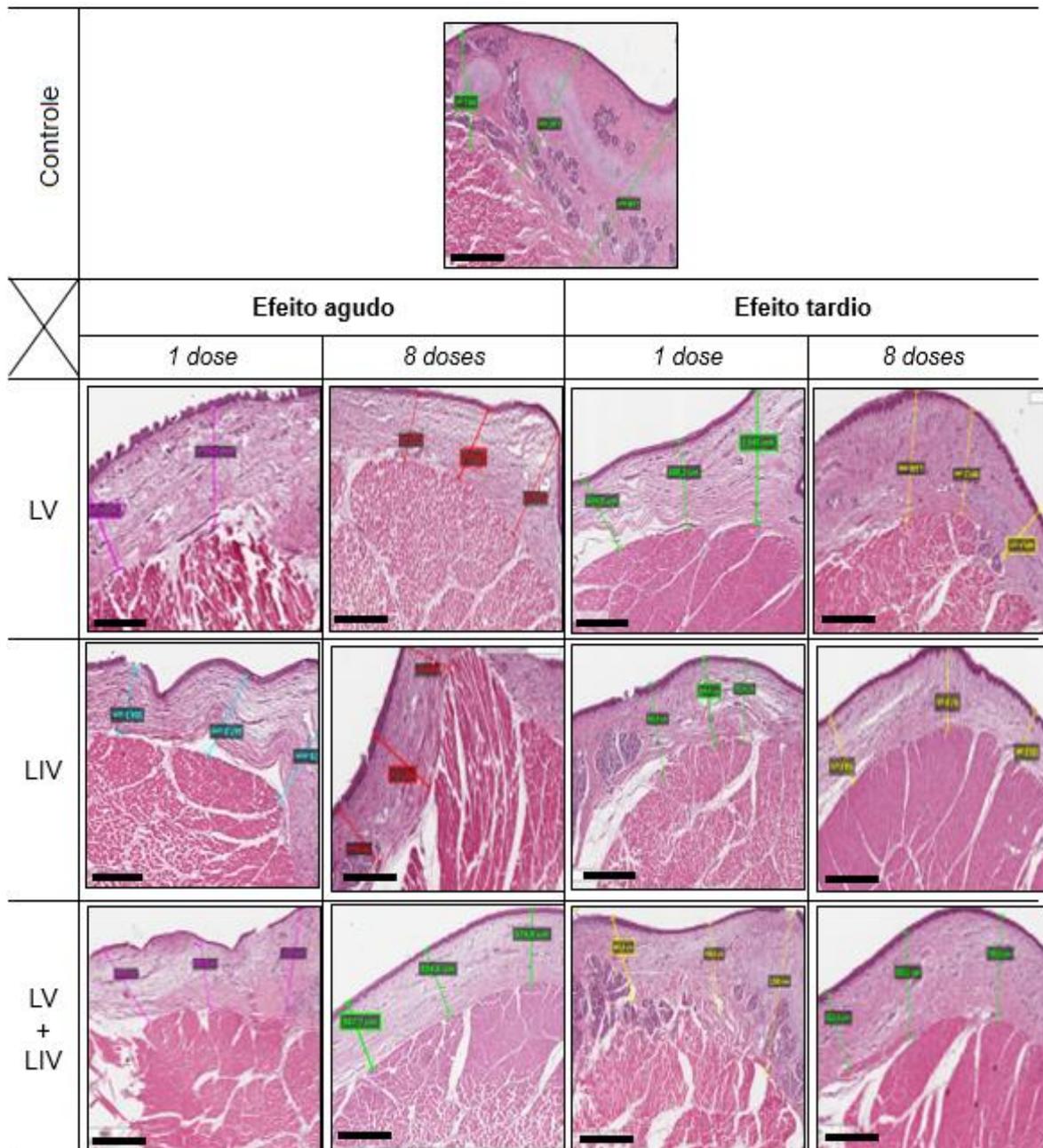
**Tabela 6.** Efeitos agudo e tardio da aplicação de 1 e 8 doses do laser do LBP na largura da mucosa associada à prega vocal de suínos adultos.

Total de doses	Grupos	Efeito	Média $\pm$ DP	Mediana	Teste estatístico valor de p
0	Controle*	-	1,5 $\pm$ 0,1*®	1,6	AN+SNK p = 0,0149
1	LV	Agudo	1,5 $\pm$ 0,7	1,5	
	LIV		0,7 $\pm$ 0,2	0,7	
	LV+LIV		0,8 $\pm$ 0,1	0,9	
1	LV	Tardio	0,8 $\pm$ 0,2	0,8	AN+SNK p = 0,0229
	LIV		1,1 $\pm$ 0,4*	1,3	
	LV+LIV		0,8 $\pm$ 0,4&	0,6	
8	LV	Agudo	1,0 $\pm$ 0,4	0,6	AN+SNK p = 0,0170
	LIV		0,6 $\pm$ 0,1®	1,1	
	LV+LIV		0,8 $\pm$ 0,2	0,7	
	LV	Tardio	1,0 $\pm$ 0,5	1,0	KW+D p > 0,05
	LIV		0,9 $\pm$ 0,4	0,7	
	LV+LIV		0,7 $\pm$ 0,1	0,7	

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho; \*o grupo controle foi comparado juntamente com os demais grupos.



**Figura 13.** Efeito agudo e tardio de 1 dose ou 8 doses na largura da mucosa associada à prega vocal de suínos, com a aplicação do LV (LV), aplicação do LIV (LIV) e combinada dos lasers vermelho e infravermelho (LIV+V). Comparado ao controle houve redução na largura da mucosa com: LV+LIV (dose única ou múltiplas doses); LIV (1 dose/tardio e 8 doses/agudo); LV (1 dose/agudo) (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Também, com 1 dose/agudo a largura da mucosa foi menor com LV comparado ao LV+LIV (ANOVA,  $p < 0,05$ ).



**Figura 14.** Fotomicrografias representativas da largura da mucosa do 1/3 médio da prega vocal da laringe de suínos dos grupos controle e experimentais – conforme distribuídos na tabela 1. Coloração: hematoxilina-eosina. Barra de aumento = 25 µm.

#### 4.3.2. Tecido conjuntivo

##### 4.3.2.1. Total de fibroblastos / fibrócitos no tecido conjuntivo da laringe de suínos

Efeito agudo e tardio no total de fibroblastos/fibrócitos no tecido conjuntivo da laringe de suínos, após a aplicação dos LBPs são mostrados na tabela 7 e

figuras 15 e 16.

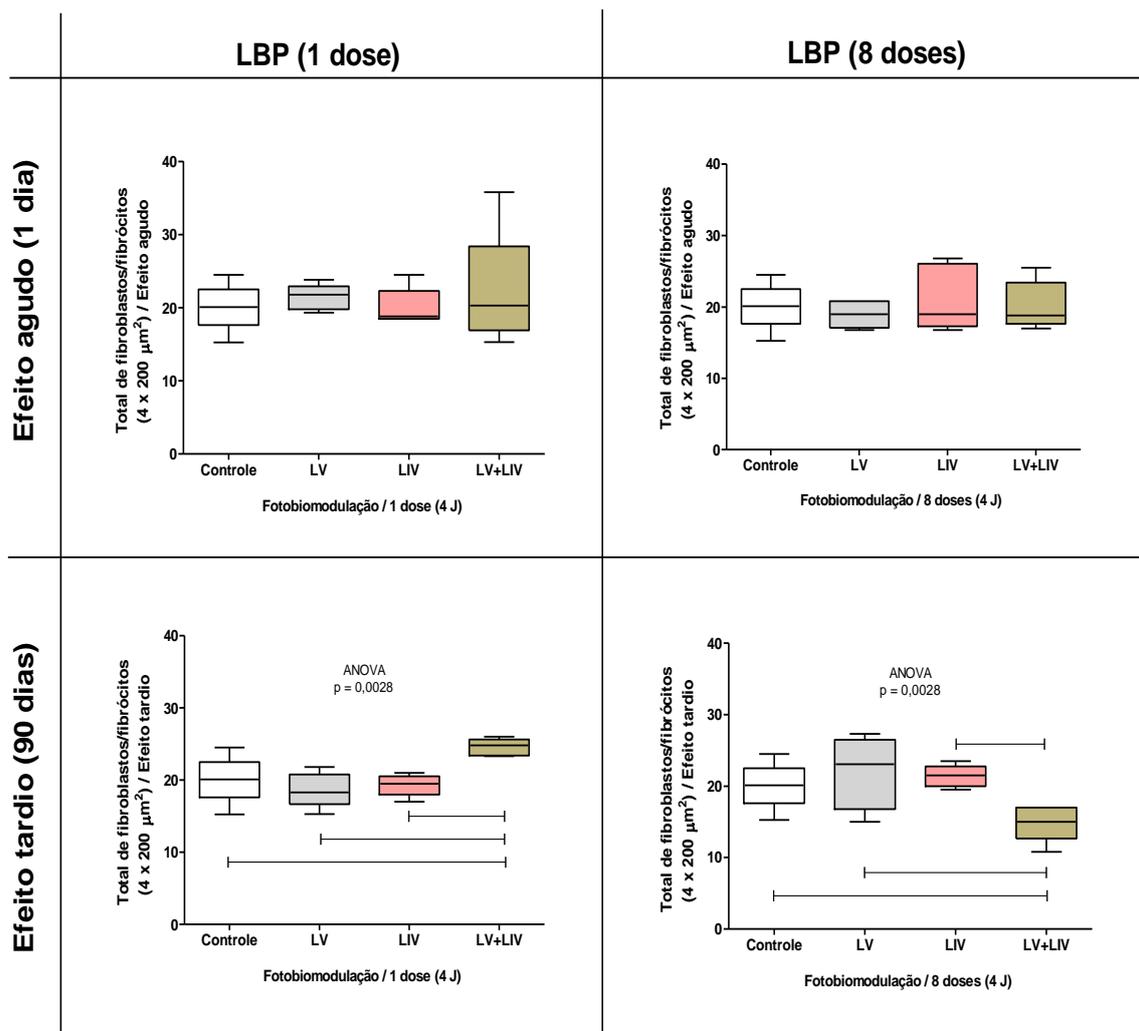
Os resultados, analisados pelo teste de ANOVA + Student-Newman-Keuls ou Kruskal-wallis + Dunn, mostraram que o efeito, agudo ou tardio, com dose única dos lasers (LV, LIV, LV+LIV) não afetaram o número de fibroblastos/fibrócitos, quando comparado ao grupo controle ou entre eles ( $p > 0,05$ ).

Para o efeito tardio, os resultados analisados pelo teste de ANOVA + Student-Newman-Keuls, mostraram que os grupos tratados com dose única do LV ou LIV diminuíram o número de fibroblastos/fibrócitos, na comparação com o grupo controle ( $p = 0,0028$ ). Além disso, o número de fibroblastos/fibrócitos foi menor com as múltiplas doses dos lasers combinados (LV+LIV), comparado ao controle e aos grupos tratados com LV ou LIV ( $p = 0,0029$ ).

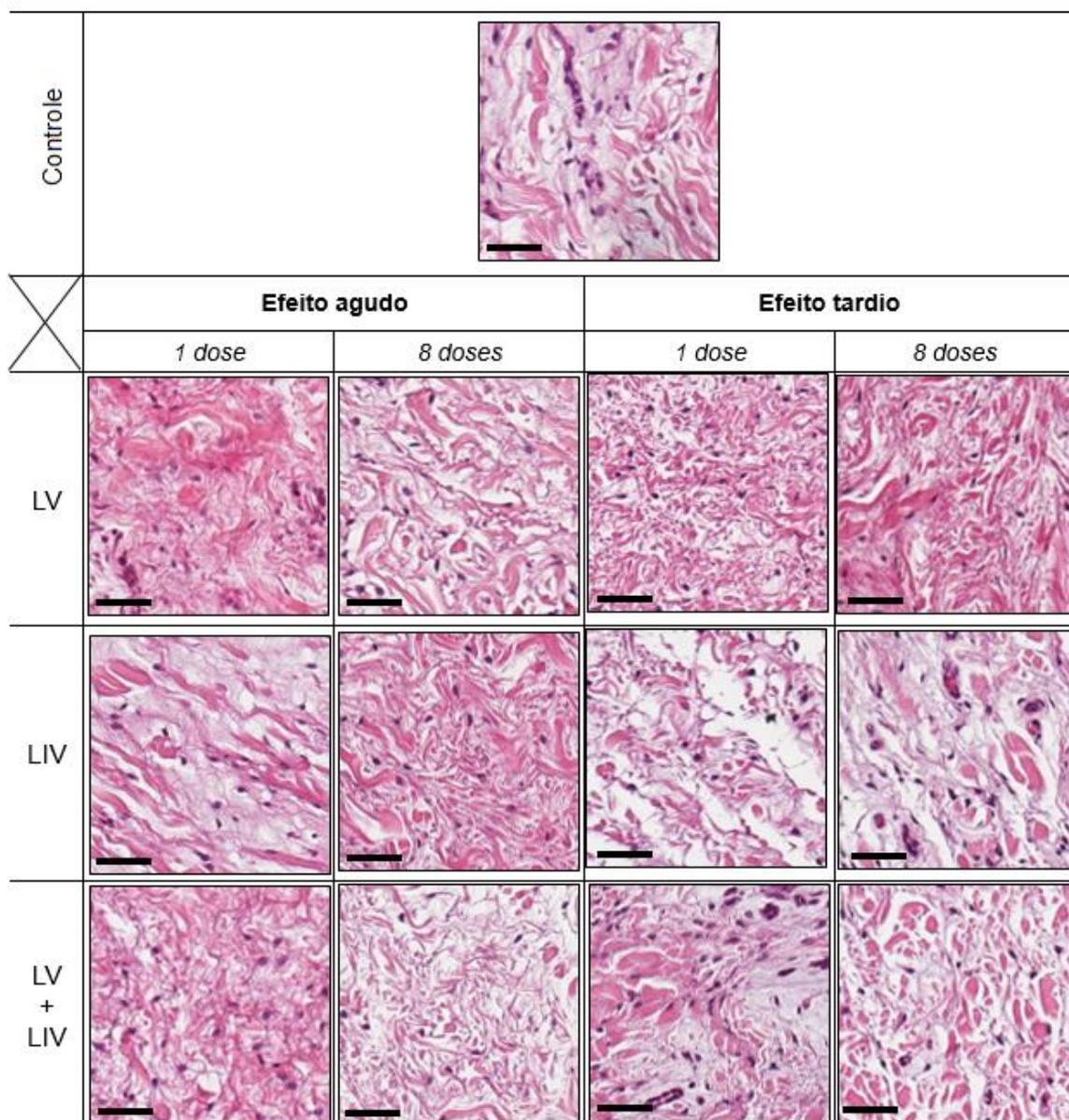
**Tabela 7.** Efeitos agudo e tardio da aplicação de 1 e 8 doses do LBP na quantidade de fibroblastos/fibrócitos do tecido conjuntivo na laringe de suínos adultos.

Total de doses	Tratamento	Efeito	Média ± DP	Mediana	Teste estatístico valor de p
0	Controle	-	20,7 ± 3,3* <sup>*</sup>	20,1	-
1	LV	Agudo	21,4 ± 1,7	21,8	Kruskal-Wallis $p > 0,05$
	LIV		20,1 ± 2,6	18,8	
	LV +LIV		22,2 ± 7,9	20,3	
	LV	Tardio	18,6 ± 2,4*	18,3	ANOVA $p = 0,0028$
	LIV		19,3 ± 1,5*	19,5	
	LV+LIV		24,6 ± 1,2*	24,8	
8	LV	Agudo	18,9 ± 1,9	19,0	ANOVA $p > 0,05$
	LIV		21,1 ± 4,6	19,0	
	LV +LIV		20,2 ± 3,4	18,8	
	LV	Tardio	22,1 ± 5,2*	23,1	ANOVA $p = 0,0029$
	LIV		21,4 ± 1,5*	21,5	
	LV+LIV		14,9 ± 2,5* <sup>*</sup> <sup>*</sup> <sup>*</sup>	15,0	

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho. Os \* indicam os pares com diferença estatística.



**Figura 15.** Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses do LBP (LV, LIV, LIV+V) no total de fibroblastos/fibrócitos na mucosa da laringe de suínos. Os resultados mostraram que n° de fibroblastos/fibrócitos não diferiu no efeito agudo (1 ou 8 doses) com nenhum LBP (ANOVA;  $p > 0,05$ ). Para o efeito tardio com dose única, o LV ou LIV diminuíram o n° de células, comparado ao controle ( $p = 0,0028$ ), assim como as múltiplas doses dos lasers combinados reduziram o n° das células quando comparado aos grupos controle, LV e LIV (ANOVA;  $p = 0,0028$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.



**Figura 16.** Fotomicrografias representativas do n° de fibroblastos no tecido conjuntivo do 1/3 médio da prega vocal da laringe de suínos ( $4 \times 200 \mu\text{m}^2$ ) dos grupos controle e experimentais – conforme distribuídos na tabela 1. Coloração: hematoxilina-eosina. Barra de aumento =  $25 \mu\text{m}$ .

#### 4.3.2.2. Intensidade da expressão das fibras colágenas – colágeno tipo I

Efeito agudo e tardio na intensidade da expressão das fibras colágenas (colágeno tipo I) no tecido conjuntivo da laringe de suínos, após a aplicação do laser de baixa potência. Os resultados estão apresentados na tabela 8 e figura 17 e figura 18.

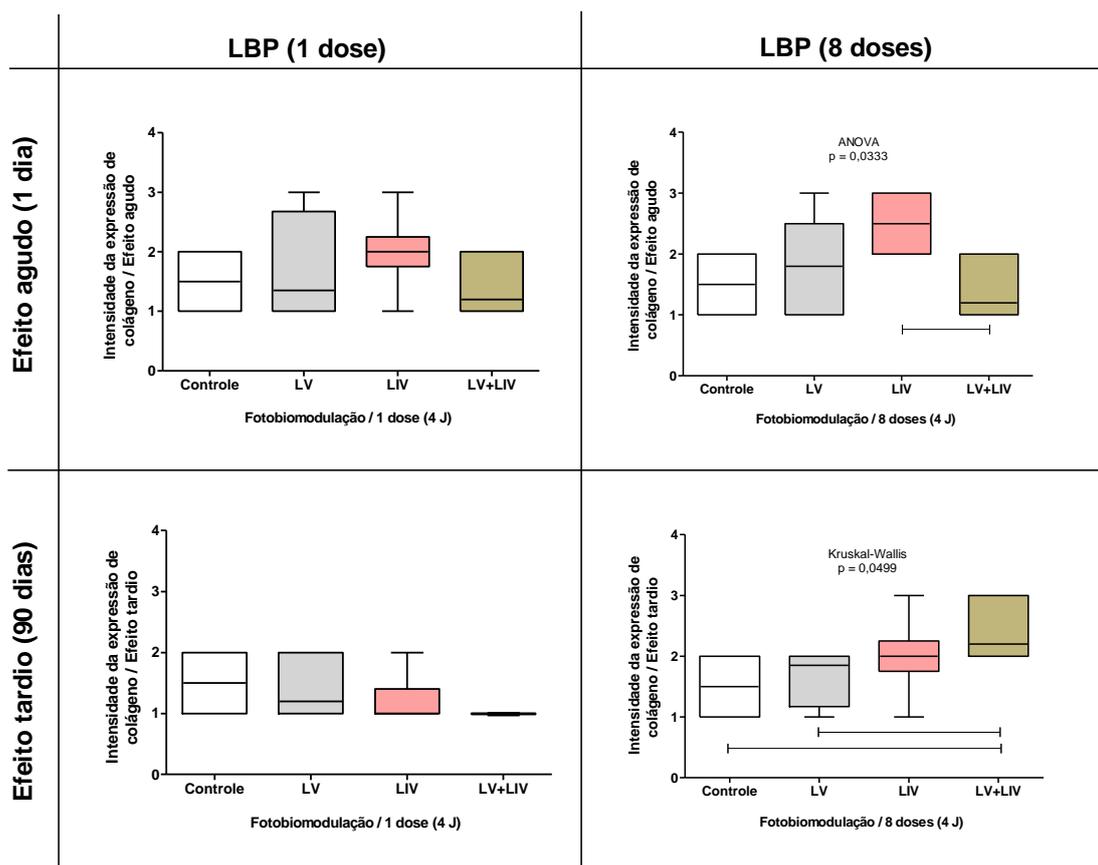
Os resultados não apontam variação na intensidade da expressão das fibras colágenas no efeito agudo ou tardio com 1 dose do LV, LIV e LV+LIV, comparado ao controle.

O efeito agudo das múltiplas doses do LIV aumentou a intensidade das fibras colágenas, comparado ao LV+LIV (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p = 0,033$ ), enquanto o efeito tardio foi maior com LV+LIV, comparado ao LV e ao controle (Kruskal Wallis,  $p < 0,0499$ ).

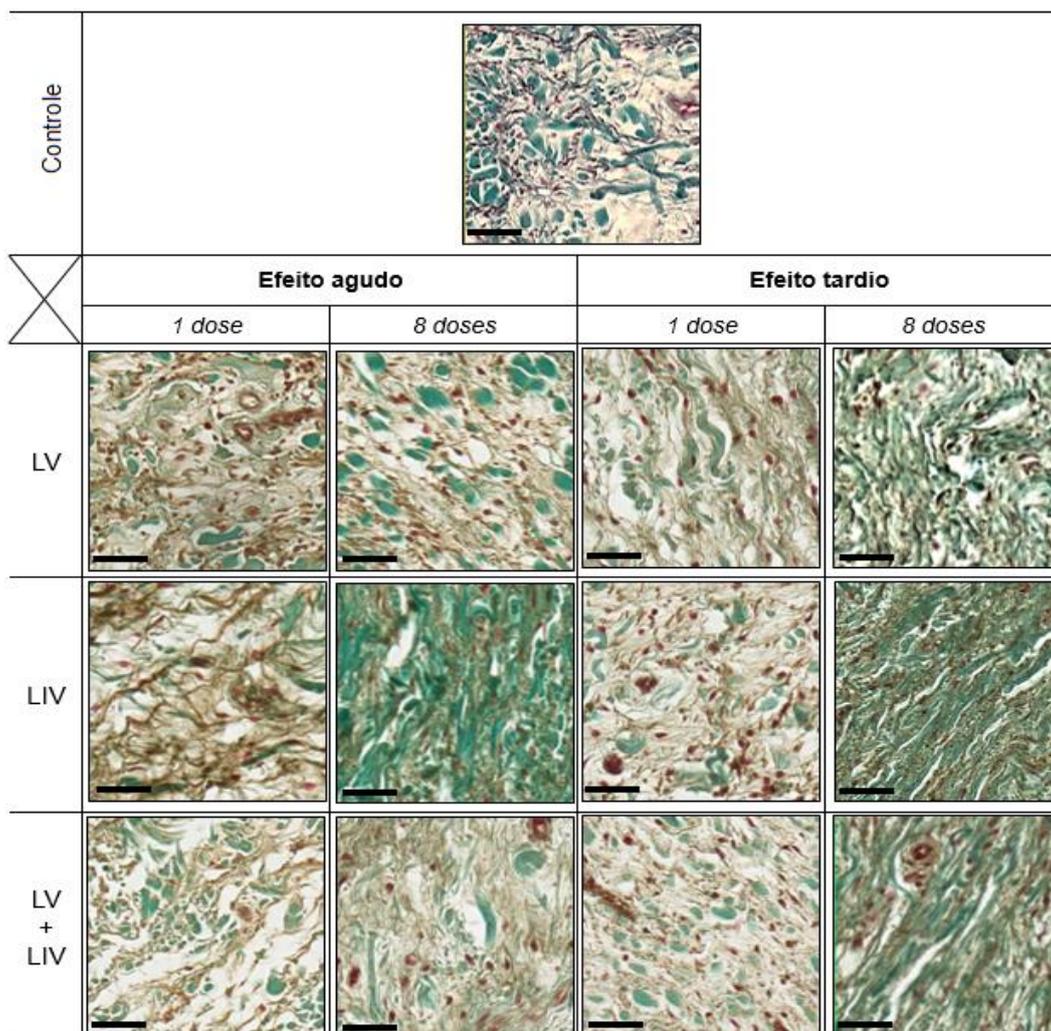
**Tabela 8.** Efeitos agudo e tardio da aplicação de 1 e 8 doses do LBP na quantidade de fibras colágenas da mucosa laríngea dos suínos adultos.

Total de doses	Tratamento	Efeito	Média ± DP	Mediana	Teste estatístico valor de p
0	Controle	-	1,5 ± 0,5*	1,5	-
1	LV	Agudo	1,7 ± 0,9	1,4	Kruskal-Wallis > 0,05
	LIV		2,0 ± 0,6	2,0	
	LV +LIV		1,4 ± 0,5	1,2	
	LV	Tardio	1,4 ± 0,5	1,2	
	LIV		1,2 ± 0,4	1,0	
	LV+LIV		1,0 ± 0,0	1,0	
8	LV	Agudo	1,8 ± 0,8	1,8	ANOVA = 0,033
	LIV		2,5 ± 0,5*	2,5	
	LV +LIV		1,4 ± 0,5*	1,2	
	LV	Tardio	1,7 ± 0,5*	1,9	Kruskal-Wallis = 0,0499
	LIV		2,0 ± 0,6	2,0	
	LV+LIV		2,4 ± 0,5**	2,2	

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho. Os \* indicam os pares com diferença estatística.



**Figura 17.** Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses do LBP (LV, LIV, LV+LIV) na intensidade das fibras colágenas. A intensidade das fibras não diferiu com 1 dose, efeito agudo ou tardio do LBP (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ; ANOVA,  $p > 0,05$ ), assim como para o efeito agudo com 8 doses do LV (ANOVA,  $p > 0,05$ ). O LIV aumentou a expressão de colágeno, comparado aos lasers combinados (ANOVA,  $p = 0,0333$ ). As múltiplas doses dos lasers combinados (LV+LIV) aumentaram o colágeno, quando comparado ao LV e ao controle (Kruskal Wallis,  $p < 0,0499$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.



**Figura 18.** Fotomicrografias representativas da intensidade das fibras colágenas na mucosa da laringe de suínos ( $4 \times 200 \mu\text{m}^2$ ) dos grupos controle e experimentais. Coloração tricrômio de Gomori. Barra de aumento =  $25 \mu\text{m}$ .

#### 4.3.2.3. Intensidade das fibras do sistema elástico

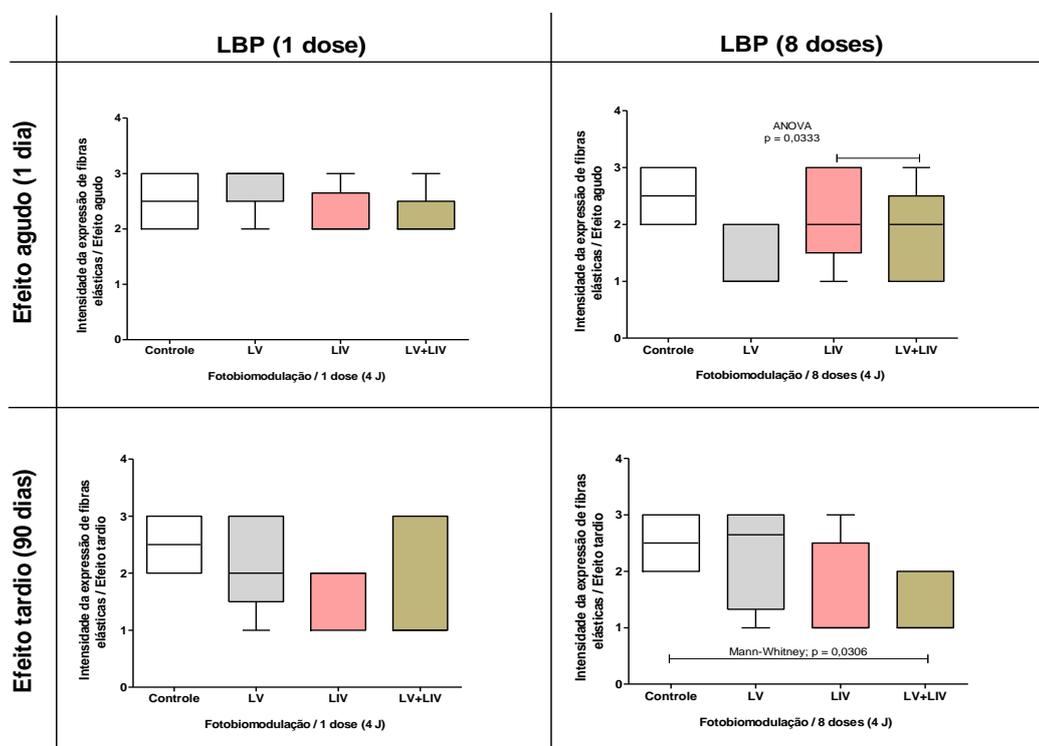
A tabela 9 e figuras 19 e 20 mostram os resultados do efeito agudo, em que não houve variação na intensidade das fibras do sistema elástico com 1 dose do LV, LIV ou LV+LIV, enquanto que para as múltiplas doses, o LIV aumentou a intensidade das fibras elásticas, na comparação com os lasers combinados, LV+LIV (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p = 0,0333$ ).

No efeito tardio, os resultados mostraram que a dose única dos lasers isolados (LV ou LIV) ou combinados (LV+LIV) não afetaram a intensidade das fibras elásticas, mas nas múltiplas doses, o LV+LIV reduziu a expressão de fibras elásticas, quando comparados ao controle (Mann-Whitney,  $p = 0,0306$ ).

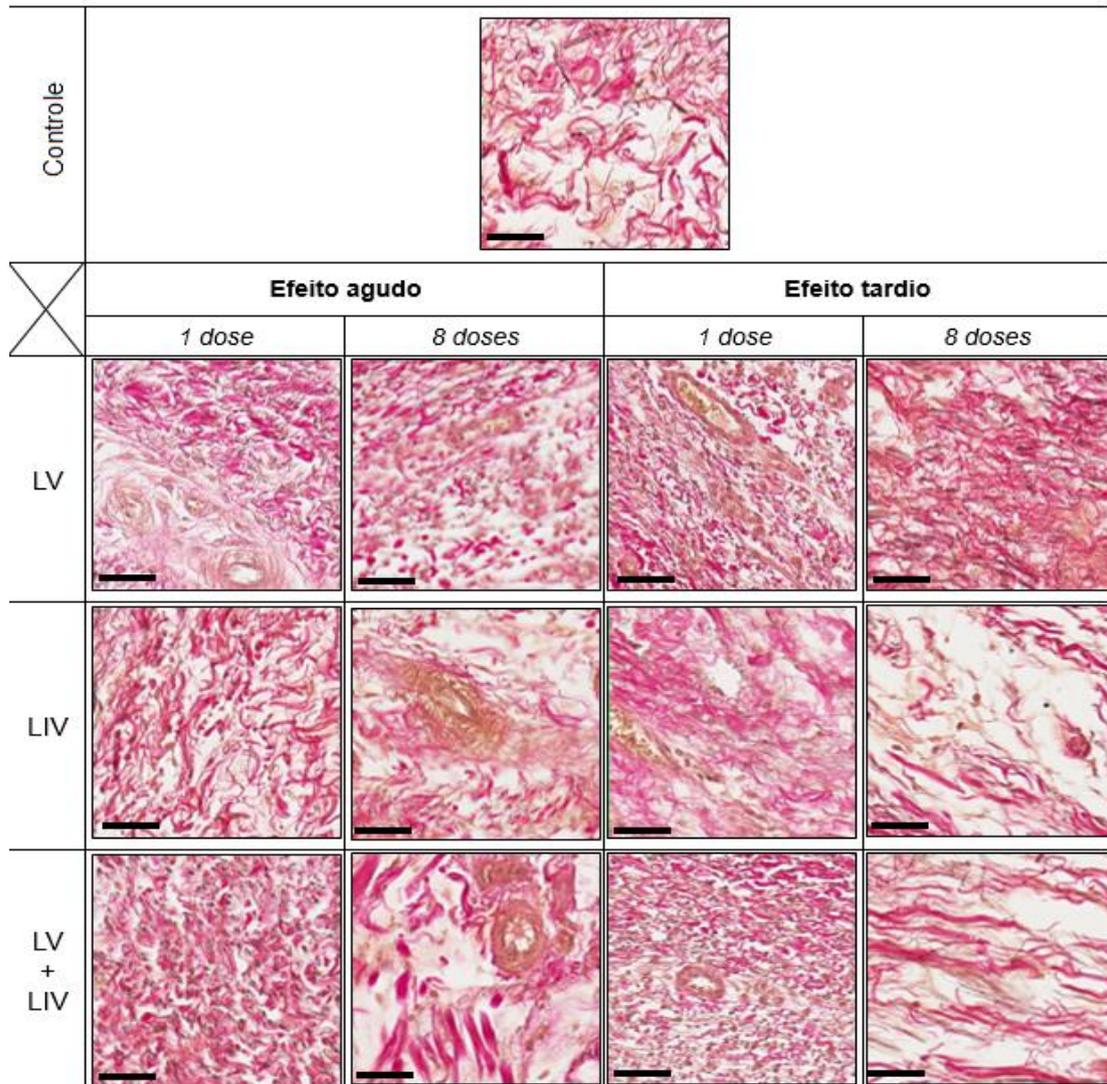
**Tabela 9.** Efeito agudo e tardio da aplicação de 1 e 8 doses do LBP na intensidade da das fibras elásticas da mucosa laríngea dos suínos adultos.

Total de doses	Tratamento	Efeito	Média ± DP	Mediana	Teste estatístico valor de p
0	Controle	-	2,5 ± 0,5*	2,5	-
1	LV	Agudo	2,8 ± 0,4	3,0	> 0,05
	LIV		2,3 ± 0,4	2,0	
	LV+LIV		2,2 ± 0,4	2,0	
	LV	Tardio	2,5 ± 0,5	2,0	
	LIV		2,2 ± 0,8	2,0	
	LV+LIV		1,6 ± 0,5	1,0	
8	LV	Agudo	1,4 ± 0,5	1,0	ANOVA, p = 0,0333
	LIV		2,2 ± 0,8*	2,0	
	LV+LIV		1,8 ± 0,8*	2,0	
	LV	Tardio	2,3 ± 0,9	2,7	Mann-Whitney p = 0,0306
	LIV		1,6 ± 0,9	1,0	
	LV+LIV		1,4 ± 0,5*	1,0	

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho. Os \* indicam os pares com diferença estatística.



**Figura 19.** Efeito agudo e tardio de dose única ou 8 doses do LBP na intensidade das fibras elásticas. Para o efeito agudo, a dose única do LV, LIV ou LV+LIV não afetaram as fibras elásticas, mas 8 doses do LIV aumentou a intensidade dessas fibras, comparado ao LV+LIV (ANOVA + Student-Newman-Keuls, p = 0,0333). Tardiamente, 1 dose dos 3 LBPs não afetaram as fibras elásticas, mas com 8 doses do LBP combinados as fibras foram menos intensas do que o controle (Mann-Whitney, p = 0,0306). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.



**Figura 20.** Fotomicrografias representativas da intensidade das fibras elásticas na mucosa laringea de suínos adultos ( $4 \times 200 \mu\text{m}^2$ ) dos grupos controle e experimentais. Coloração: Weigert. Barra de aumento =  $25 \mu\text{m}$ .

#### 4.3.2.4. Intensidade das fibras nervosas na mucosa

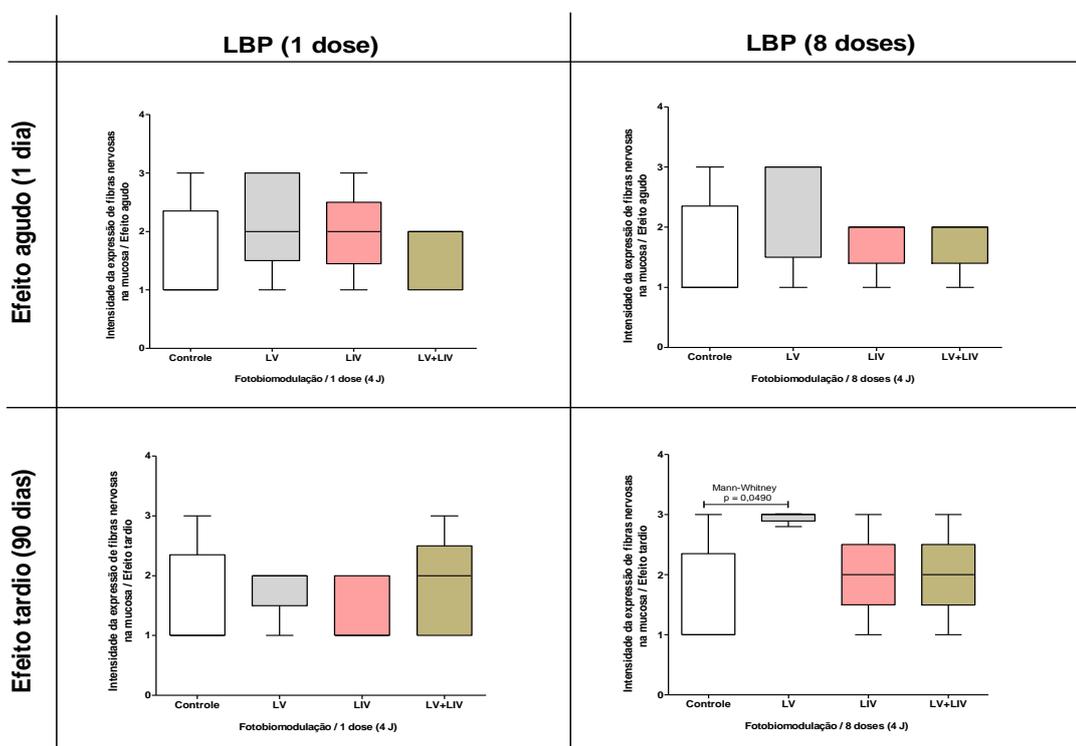
Efeito agudo e tardio dos LBPs na intensidade das fibras nervosas da mucosa são mostrados na tabela 10 e figuras 21 e 22.

Os resultados das análises mostraram que não houve diferença na intensidade da expressão das fibras nervosas para o efeito agudo com dose única do LV, LIV e LV+LIV, assim como para as múltiplas doses dos 3 LBPs (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p > 0,05$ ).

Para o efeito tardio, apenas as múltiplas doses do LV aumentaram a intensidade das fibras nervosas, na comparação com o grupo controle (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p = 0,049$ ).

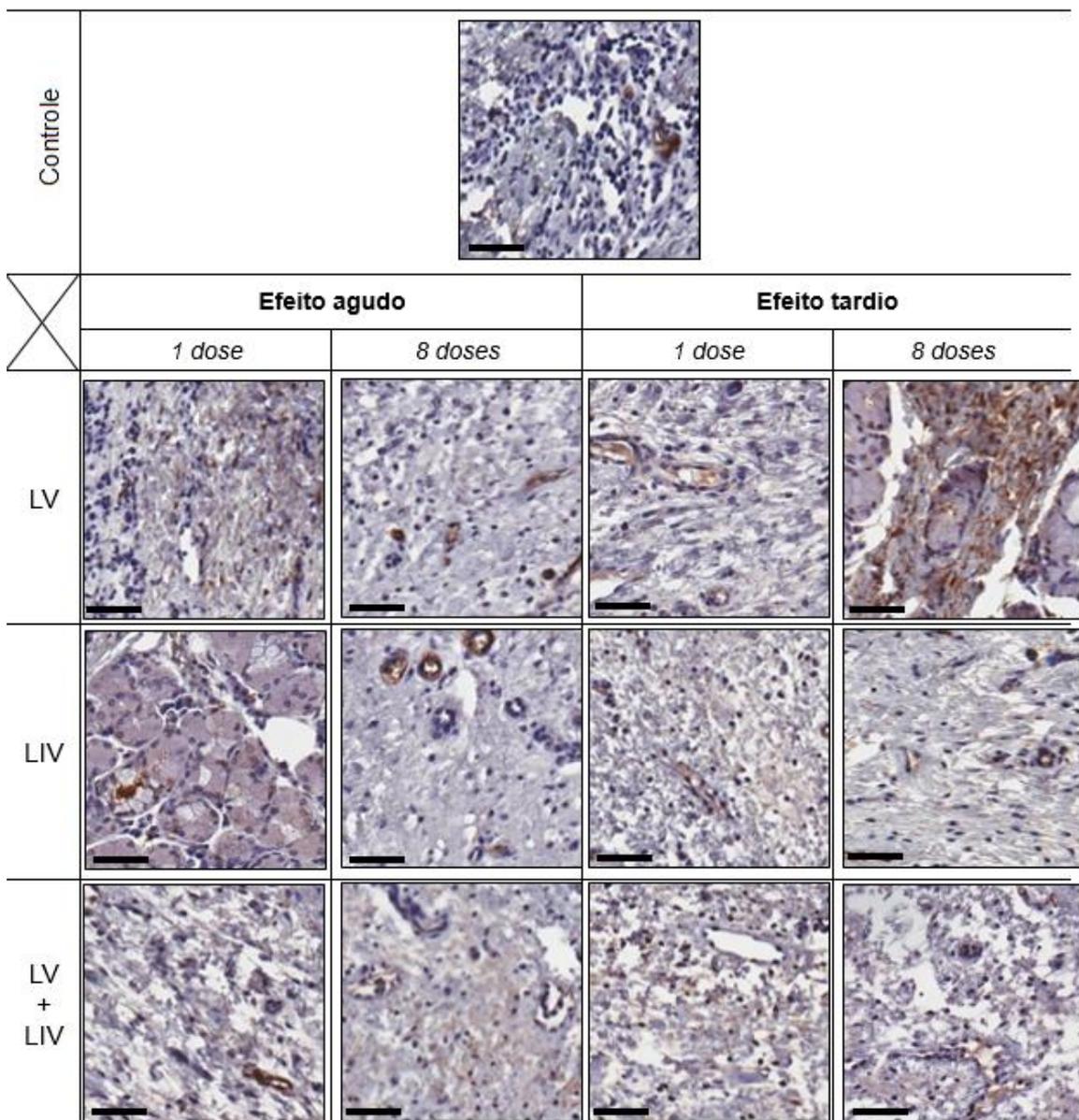
**Tabela 10.** Efeito agudo e tardio de 1 e 8 doses do LBP na intensidade das fibras nervosas na mucosa da laringe de suínos adultos.

Total de doses	Tratamento	Efeito	Mediana	Teste estatístico valor de p
0	Controle	-	1,0*	-
1	LV	Agudo	2,0	Kruskal-Wallis p > 0,05
	LIV		2,0	
	LV +LIV		2,0	
	LV	Tardio	2,0	
	LIV		1,0	
	LV+LIV		2,0	
8	LV	Agudo	3,0	Kruskal-Wallis p = 0,049
	LIV		2,0	
	LV +LIV		2,0	
	LV	Tardio	3,0*	
	LIV		2,0	
	LV+LIV		2,0	



LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho. O \* indica os pares com diferença estatística

**Figura 21.** Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses dos LBPs (LV, LIV, LV+LIV) na intensidade das fibras nervosas na mucosa da laringe de suínos adultos. O efeito agudo da dose única ou as múltiplas doses dos LBPs não afetaram a intensidade das fibras nervosas, comparado ao controle ou entre eles (Kruskal-Wallis, p > 0,05). Tardiamente, apenas as múltiplas doses do LV aumentaram a intensidade das fibras nervosas, na comparação com o grupo controle (Kruskal-Wallis + Dunn, p = 0,049). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.



**Figura 22.** Fotomicrografias representativas da intensidade das fibras nervosas na mucosa da laringe dos suínos adultos ( $4 \times 200 \mu\text{m}^2$ ) dos grupos controle e experimentais. Coloração: imuno-histoquímica para a proteína S-100. Barra de aumento =  $25 \mu\text{m}$ .

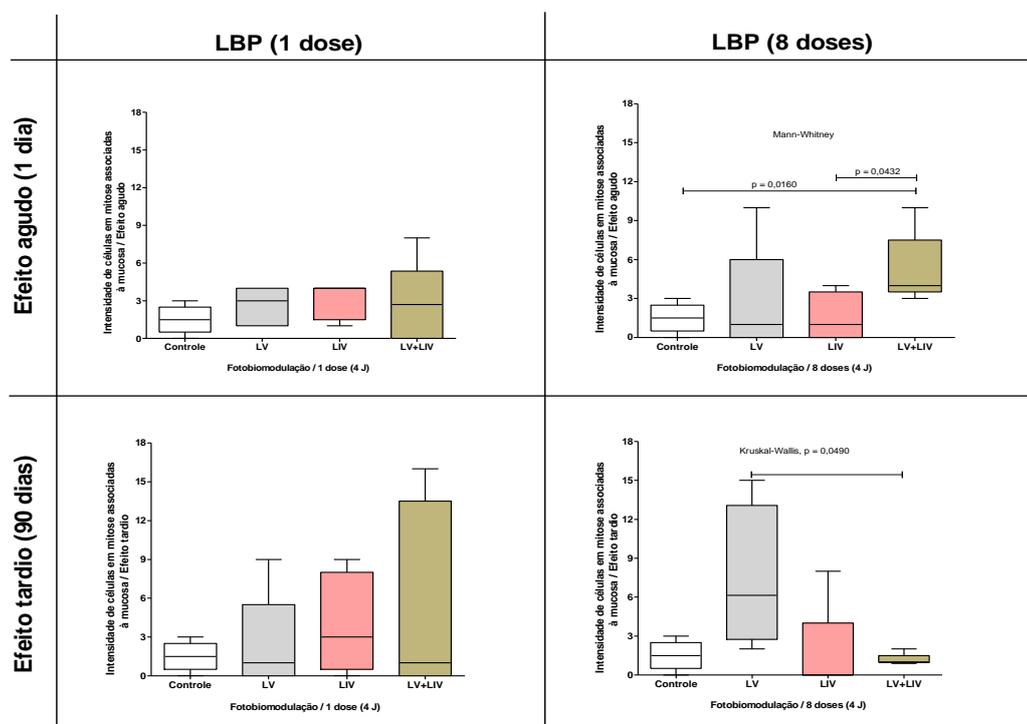
#### 4.3.2.5. Intensidade de células em mitose associadas à mucosa

Os resultados mostraram que a aplicação de dose única dos lasers, isolados ou combinados, não afetaram de forma aguda ou tardia o total de células em mitose na mucosa da laringe (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p > 0,05$ ). As múltiplas doses do LV+LIV aumentaram de forma aguda o total de células em mitose, comparado ao controle e ao LIV (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p = 0,0333$ ), mas tardiamente, o total de células em mitose foi maior com o LV do que os lasers combinados (LV+LIV) (Mann-Whitney,  $p = 0,0306$ ) (Tabela 11 e figuras 23 e 24).

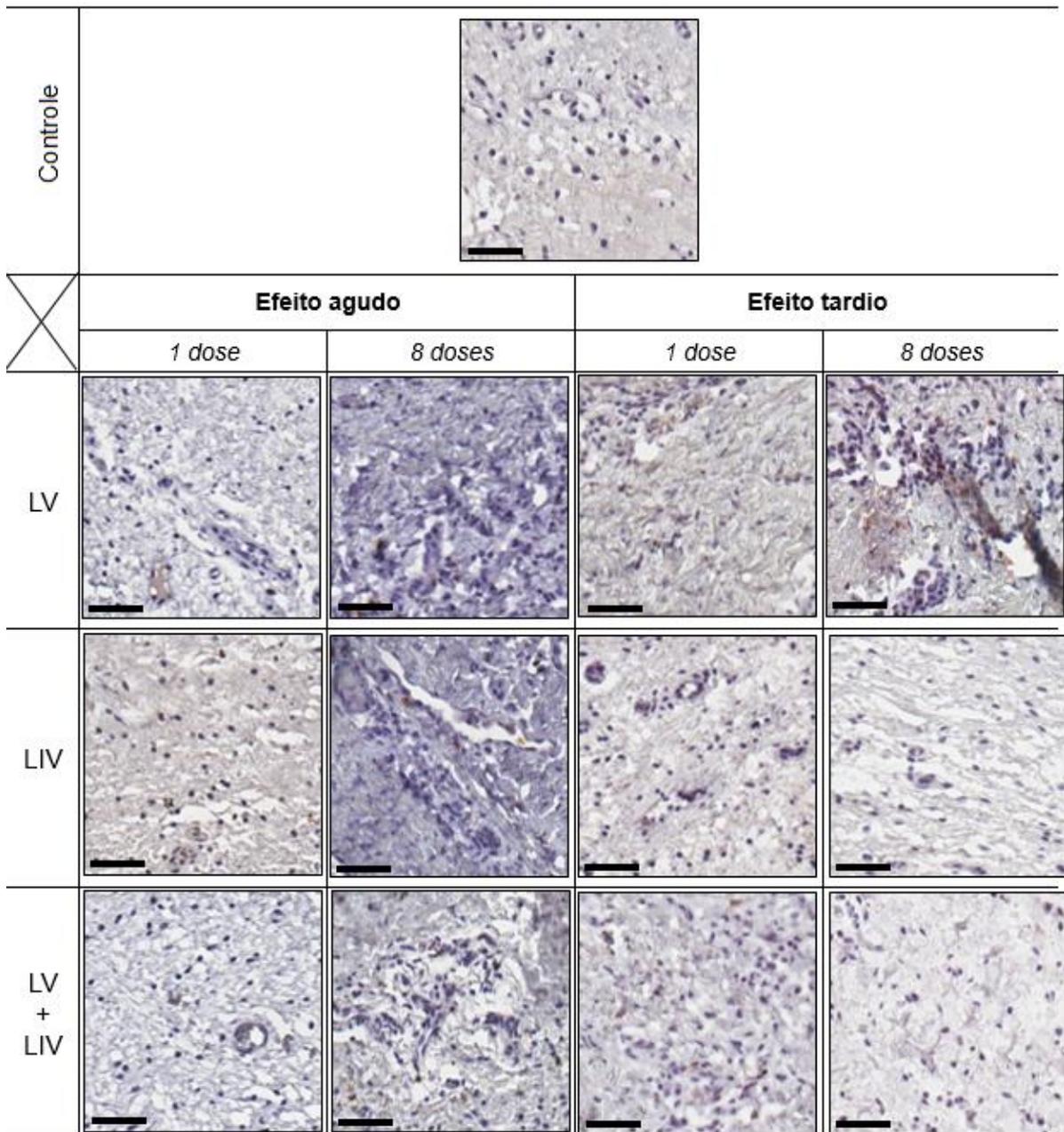
**Tabela 11.** Efeitos agudo e tardio de 1 e 8 doses do LBP no total de células em mitose associadas à mucosa da laringe de suínos

Total de doses	Tratamento	Efeito	Mediana	Teste estatístico valor de p
0	Controle	-	1,5*	-
1	LV	Agudo	3,0	> 0,05
	LIV		4,0	
	LV +LIV		2,7	
	LV	Tardio	1,0	
	LIV		3,0	
	LV+LIV		1,0	
8	LV	Agudo	1,0	ANOVA, p = 0,0333
	LIV		1,0*	
	LV +LIV		4,0**	
	LV	Tardio	6,2*	Mann-Whitney p = 0,0306
	LIV		0,1	
	LV+LIV		1,0*	

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho. Os \* indicam os pares com diferença estatística



**Figura 23.** Efeito agudo e tardio de 1 dose ou 8 doses dos LBPs no total de células em mitose associadas à mucosa da laringe de suínos adultos. De forma aguda ou tardia, o total de células em mitose não foi afetado com 1 dose dos lasers, isolados ou combinados (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p > 0,05$ ). As múltiplas doses do LV+LIV apresentaram, de forma aguda, maior número de células em mitose do que o controle ou o LIV (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p = 0,0333$ ), mas tardiamente, o total de células em mitose foi maior com o LV do que os lasers combinados (LV+LIV) (Mann-Whitney,  $p = 0,0306$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.



**Figura 24.** Fotomicrografias representativas do total de células em mitose associadas à mucosa da laringe de suínos ( $4 \times 200 \mu\text{m}^2$ ) dos grupos controle e experimentais. Coloração: imuno-histoquímica para a proteína ki67. Barra de aumento =  $25 \mu\text{m}$ .

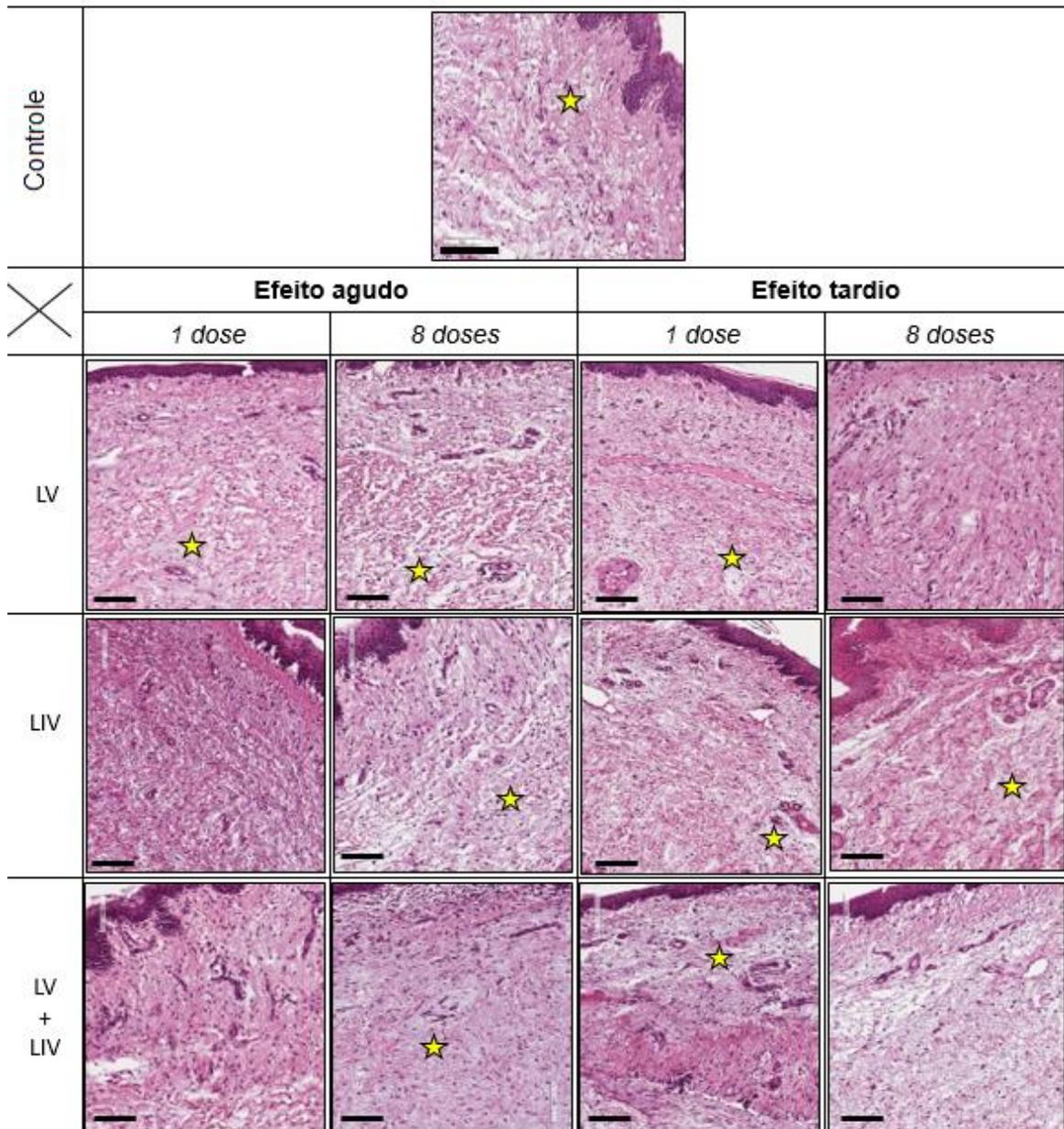
#### 4.3.2.6. Avaliação qualitativa do tecido conjuntivo

As análises mostraram presença de edema intersticial nas mucosas do grupo controle e dos animais tratados com 8 doses dos três LBPs (LV, LIV, LV+LIV) e mortos 24 horas depois do tratamento (efeito agudo); o edema também foi observado apenas nos animais tratados com 1 dose do LV.

A avaliação dos animais mortos 90 dias depois da aplicação dos LBPs mostrou edema na mucosa com a dose única do LV, LIV e LV+LIV, assim como

nas múltiplas doses do LIV, mas não com o LV ou LV+LIV, em que a mucosa estava normal e sem edema.

As células migratórias (leucócitos) estavam esparsas na mucosa profunda e mais expressiva na mucosa superficial, no entanto, nenhum dos tratamentos com LBPs ou o grupo controle apresentaram infiltrado inflamatório (ver figura 25).



**Figura 25.** Fotomicrografias da mucosa laríngea dos grupos controle e experimentais. As estrelas indicam os locais com edema intersticial. Coloração H&E. Barra de aumento = 25  $\mu$ m.

### 4.3.3. Tecido muscular estriado

#### 4.3.3.1. Total de fibras

O efeito agudo e tardio no total de fibras musculares estriadas da laringe de suínos tratados com os LBP está apresentado na tabela 12 e figuras 26 e 27.

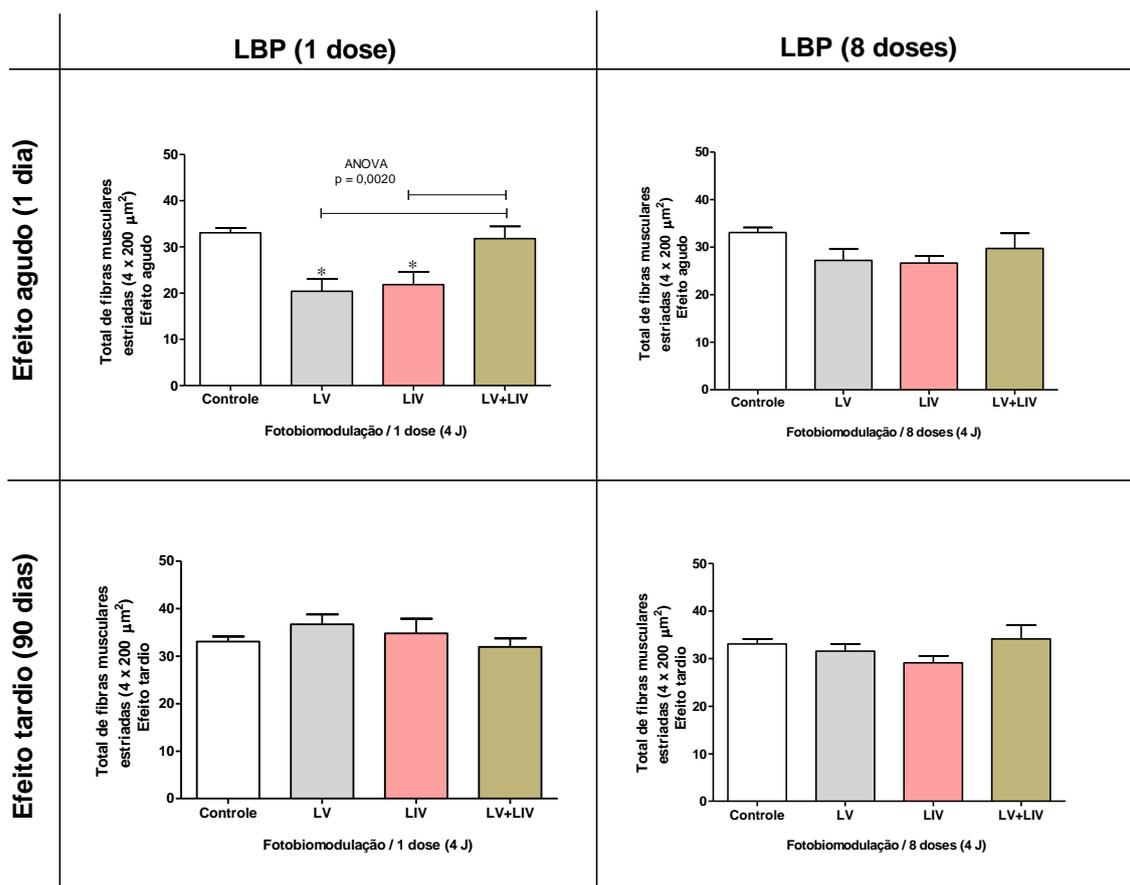
Os resultados das análises mostraram diminuição no total de fibras musculares estriadas da laringe dos suínos mortos no dia seguinte ao LBP (efeito agudo) com a dose única do LV e LIV, comparado aos grupos tratados com LV+LIV; não houve diferença entre os LPBs e o grupo controle (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

Para o efeito tardio da dose única ou, agudo e tardio, para as múltiplas doses os resultados não mostraram diferenças entre os grupos (ANOVA,  $p > 0,05$ )

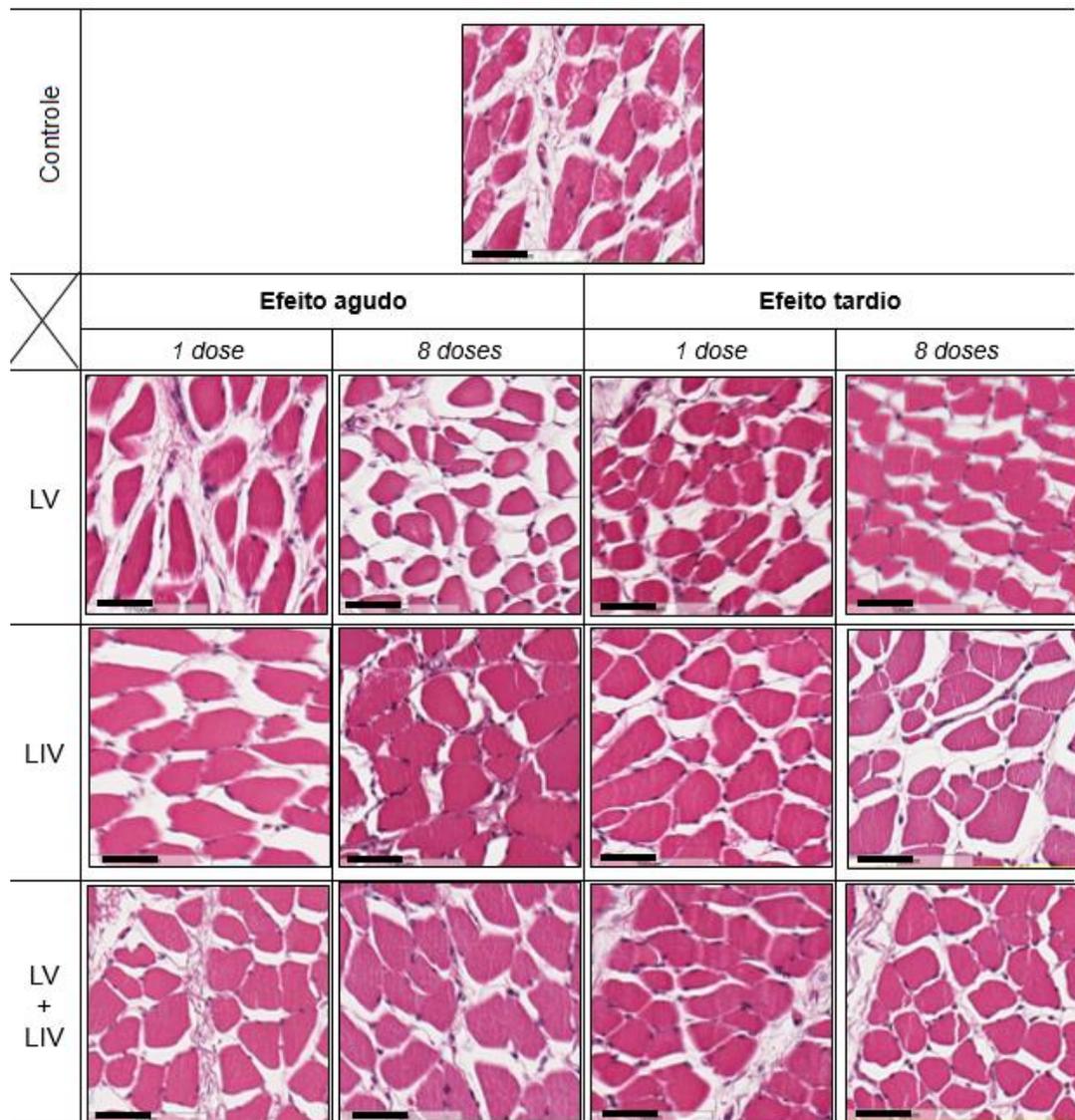
**Tabela 12** Efeito agudo e tardio de 1 e 8 doses do LPB no total de fibras musculares estriadas da laringe de suínos.

Total de doses	Tratamento	Efeito	Média±DV	Teste estatístico valor de p
0	Controle	-	33,1 ± 2,3	ANOVA p = 0,002
1	LV	Agudo	20,4 ± 5,9*	
	LIV		21,9 ± 6,1*	
	LV+LIV		31,8 ± 5,8**	
1	LV	Tardio	36,7 ± 4,6	
	LIV		34,8 ± 7,0	
	LV+LIV		31,9 ± 4,0	
8	LV	Agudo	27,2 ± 5,5	ANOVA p > 0,05
	LIV		26,7 ± 3,3	
	LV+LIV		29,8 ± 7,1	
8	LV	Tardio	31,6 ± 3,0	
	LIV		29,1 ± 3,3	
	LV+LIV		34,1 ± 6,5	

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho. Os \* indicam os pares com diferença estatística.



**Figura 26.** Efeito agudo e tardio de 1 dose ou 8 doses dos LBPs no total de fibras musculares estriadas da laringe de suínos ( $4 \times 200 \mu\text{m}^2$ ). Os resultados mostraram menor nº de fibras com dose única do LV e LIV, do que os grupos tratados com LV+LIV; não houve diferença com o controle (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ). A dose única ou as múltiplas doses dos LBPs não afetaram o efeito agudo ou agudo e tardio, respectivamente (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Estão mostrados as médias e os desvios padrão.



**Figura 27.** Fotomicrografias representativas do total de fibras musculares, mionúcleos e área da fibra da laringe de suínos dos grupos controle e experimentais. Coloração: H&E. Barra de aumento = 25  $\mu$ m.

#### 4.3.3.2. Total de mionúcleos

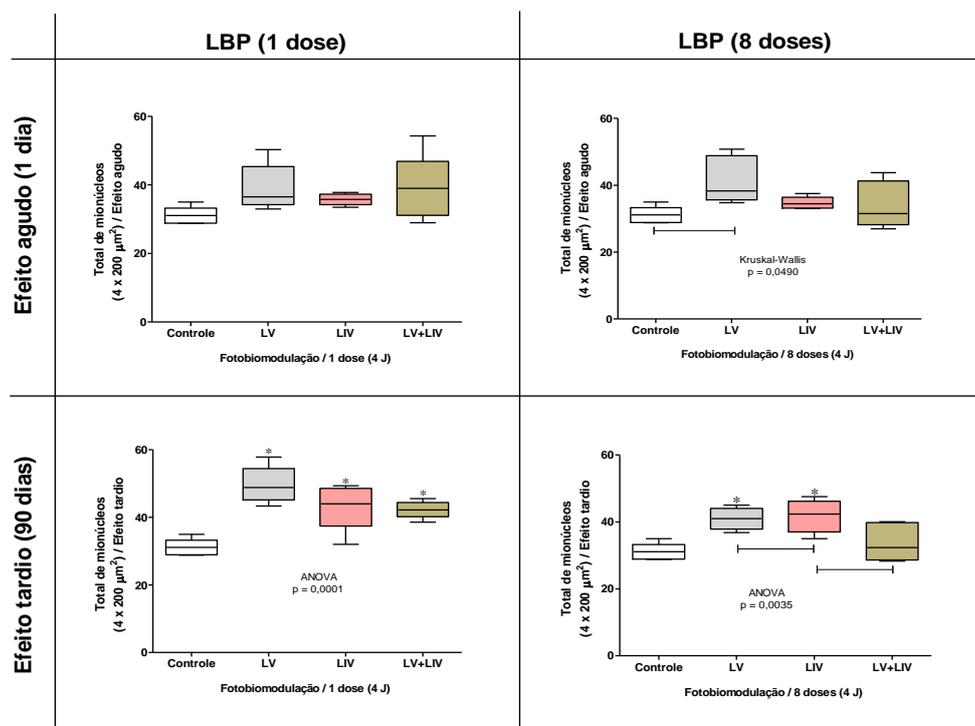
A dose única não afetou de forma aguda, o nº dos mionúcleos entre os grupos (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p > 0,05$ ); as 8 doses do LV aumentaram os mionúcleos, na comparação com o grupo controle, mas não com os demais LBPs (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p = 0,0490$ ).

O efeito tardio de 1 dose foi visto pelo maior nº de mionúcleos com LV, LIV ou LV+LIV, comparado ao controle (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p = 0,0001$ ). No entanto, 8 doses do LIV aumentaram os mionúcleos, comparado com o LV ou LV+LIV (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p = 0,0035$ ) (Ver tabela 13 e figuras 27 e 28).

**Tabela 13.** Efeito agudo e tardio de 1 e 8 doses do LBP no total de mionúcleos do tecido muscular estriado da laringe de suínos.

Total de doses	Tratamento	Efeito	Média ± DP	Mediana	Teste estatístico valor de p
0	Controle	-	31,1 ± 2,5***	31,1*	
1	LV	Agudo	39,2 ± 6,8	36,5	ANOVA p > 0,05
	LIV		35,8 ± 1,7	35,8	
	LV+LIV		39,0 ± 9,6	39,0	
1	LV	Tardio	49,6 ± 5,4*	48,8	ANOVA p = 0,0001
	LIV		43,2 ± 6,8*	44,0	
	LV+LIV		42,2 ± 2,5*	42,2	
8	LV	Agudo	41,4 ± 7,0	38,3*	Kruskal-Wallis P = 0,049
	LIV		34,7 ± 1,8	34,5	
	LV+LIV		34,1 ± 7,0	31,5	
8	LV	Tardio	40,9 ± 3,3*	41,0	ANOVA p = 0,0035
	LIV		41,4 ± 8,9**	42,3	
	LV+LIV		33,8 ± 5,6*	32,3	

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho. Os \* indicam os pares com diferença estatística.



**Figura 28.** Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses do LBP no total de mionúcleos do músculo estriado da prega vocal de suínos. Os resultados mostraram que 1 dose dos LBPs não afetaram o nº dos mionúcleos, comparado ao controle e entre eles (ANOVA, p > 0,05); os mionúcleos foram mais numerosos com 8 doses do LV, do que no controle, mas não com os demais LBPs (Kruskal-Wallis, p = 0,0490). Tardiamente, 1 dose do LV, LIV ou LV+LIV aumentou os mionúcleos comparado ao controle (ANOVA, p = 0,0001), assim como as 8 doses do LIV foi maior do que LV ou LV+LIV (ANOVA, p = 0,0035). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.

#### 4.3.3.3. Área das fibras musculares estriadas

Efeito agudo e tardio na área das fibras musculares estriadas das pregas vocais de suínos tratados com LBPs (LV, LIV, LV+LIV) são mostrados na tabela 14 e figuras 27 e 29.

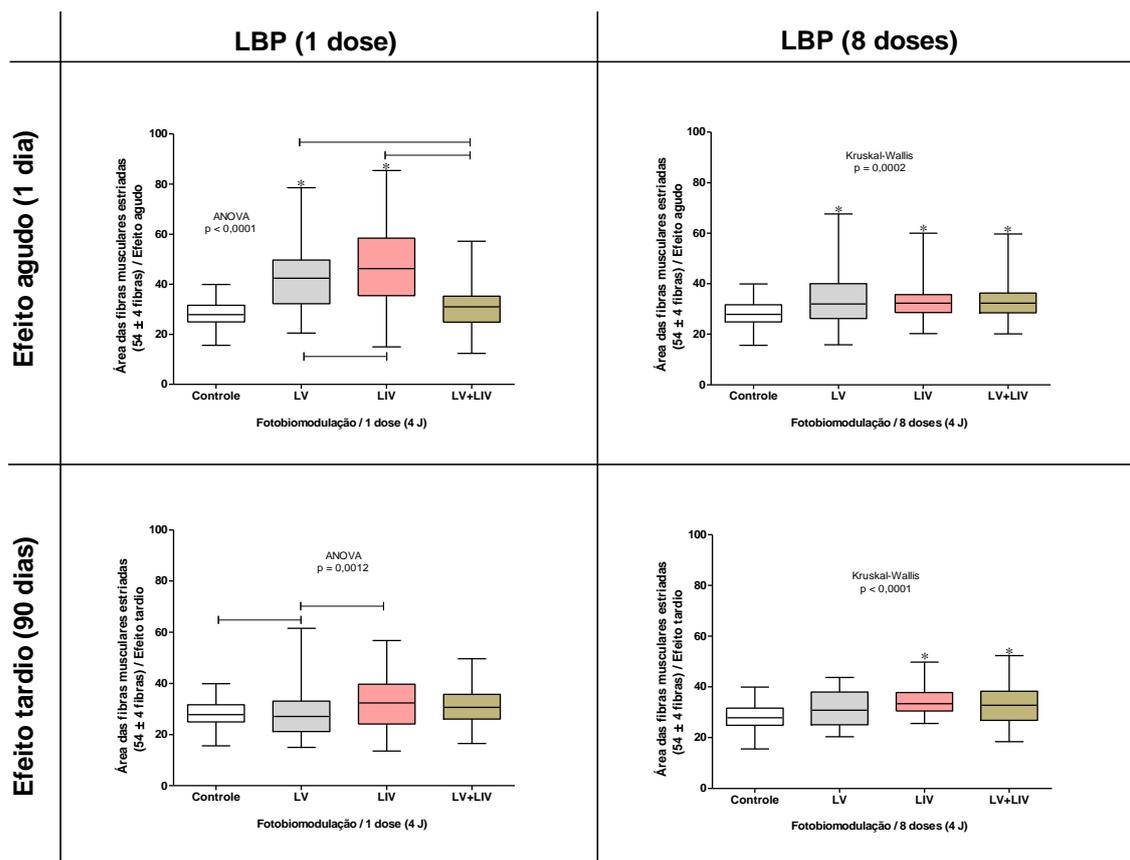
Os resultados mostraram que 1 dose do LV e LIV aumentaram de forma aguda a área das fibras, comparado ao controle; LIV aumentou a área das fibras na comparação com os demais LBPs, LV ou LV+LIV (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p < 0,0001$ ). Também, o efeito agudo das múltiplas doses dos três tipos de LBPs aumentaram a área das fibras, na comparação com o controle (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p = 0,0002$ ).

Para o efeito tardio, a dose única do LV aumentou a área das fibras estriadas, na comparação com o controle e com o LIV (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p = 0,0012$ ). Tardamente, as múltiplas doses do LV e LV+LIV aumentaram o diâmetro das fibras, comparado ao grupo controle (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p < 0,0001$ ).

**Tabela 14.** Efeito agudo e tardio de 1 e 8 doses do LBP na área das fibras musculares estriadas das pregas vocais de suínos.

Total de doses	Tratamento	Efeito	Média ± DP	Mediana	Teste estatístico valor de p	
0	Controle	-	28,4 ± 4,7 <sup>**</sup>	27,9 <sup>*****</sup>	ANOVA $p < 0,0001$	
1	LV	Agudo	43,4 ± 13,1 <sup>**</sup>	42,2		
	LIV		45,1 ± 16,2 <sup>***</sup>	46,3		
	LV+LIV		31,3 ± 9,2 <sup>*</sup>	31,0		
1	LV	Tardio	27,5 ± 8,2 <sup>*</sup>	27,1		ANOVA $p = 0,0012$
	LIV		32,8 ± 9,9 <sup>**</sup>	32,4		
	LV+LIV		30,7 ± 7,1 <sup>*</sup>	30,1		
8	LV	Agudo	34,2 ± 10,3	32,0 <sup>*</sup>	Kruskal-Wallis $p = 0,0002$	
	LIV		33,5 ± 7,5	32,3 <sup>*</sup>		
	LV+LIV		33,4 ± 6,9	32,3 <sup>*</sup>		
	8	LV	Tardio	31,8 ± 7,1	30,9	Kruskal-Wallis $p < 0,0001$
		LIV		34,3 ± 5,5	33,4 <sup>*</sup>	
		LV+LIV		33,1 ± 8,3	32,6 <sup>*</sup>	

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho. Os \* indicam os pares com diferença estatística.



**Figura 29.** Efeito agudo e tardio de 1 dose ou 8 doses na área das fibras musculares estriadas das pregas vocais de suínos tratados com LBPs (LV, LIV, LV+LIV). A dose única e aguda do LV e LIV aumentou a área das fibras, comparado ao controle, enquanto que o LIV foi maior do que LV ou LV+LIV (ANOVA,  $p < 0,0001$ ); também, as 8 doses dos LBPs aumentaram a área das fibras, comparado ao controle (Kruskal-Wallis,  $p = 0,0002$ ). Tardiamente, 1 dose do LV aumentou a área das fibras comparado ao controle e ao LIV (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $p = 0,0012$ ), assim como, LV e LV+LIV aumentaram o diâmetro comparado ao controle (Kruskal-Wallis,  $p < 0,0001$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.

#### 4.3.3.4. Integridade/Justaposição das fibras musculares

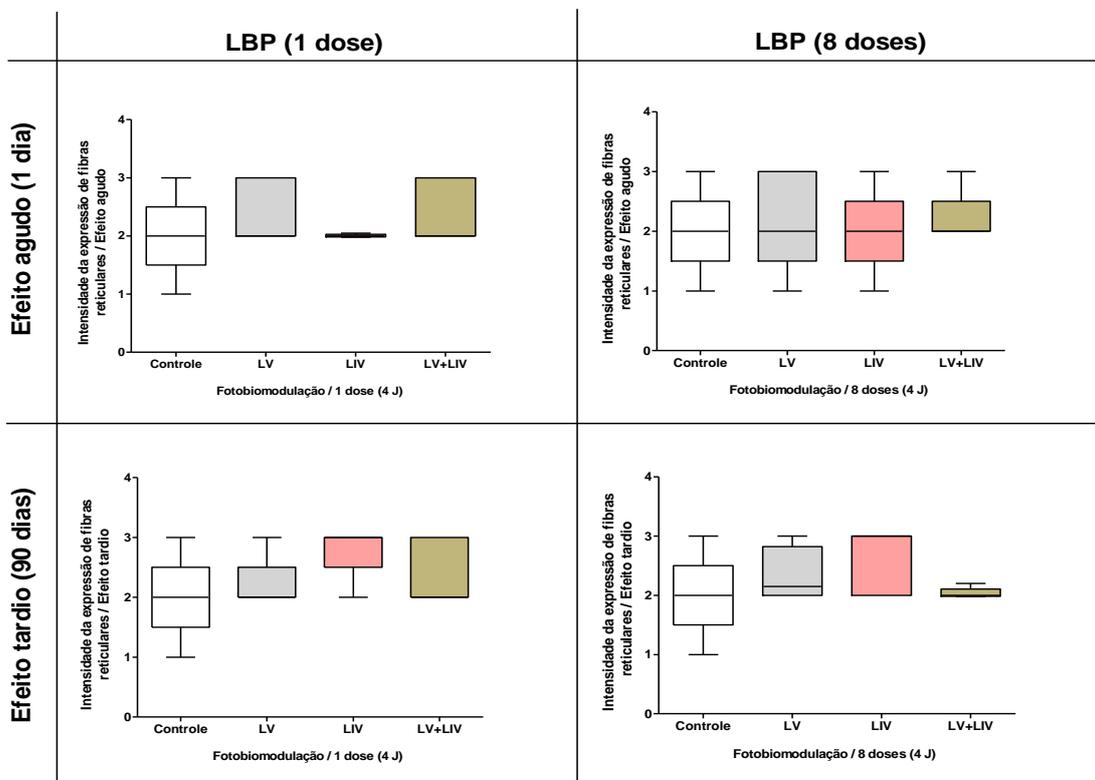
Os efeitos agudo e tardio dos LBPs na integridade e justaposição das fibras musculares na laringe de suínos estão apresentados na tabela 15 e figuras 30 e 31.

Os resultados mostraram que a expressão das fibras reticulares associadas ao endomísio das fibras musculares estriadas das pregas vocais não diferiu entre os grupos, controle ou tratados com LV, LIV ou LV+LIV, tanto para a dose única ou múltiplas doses, efeito agudo ou tardio (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ).

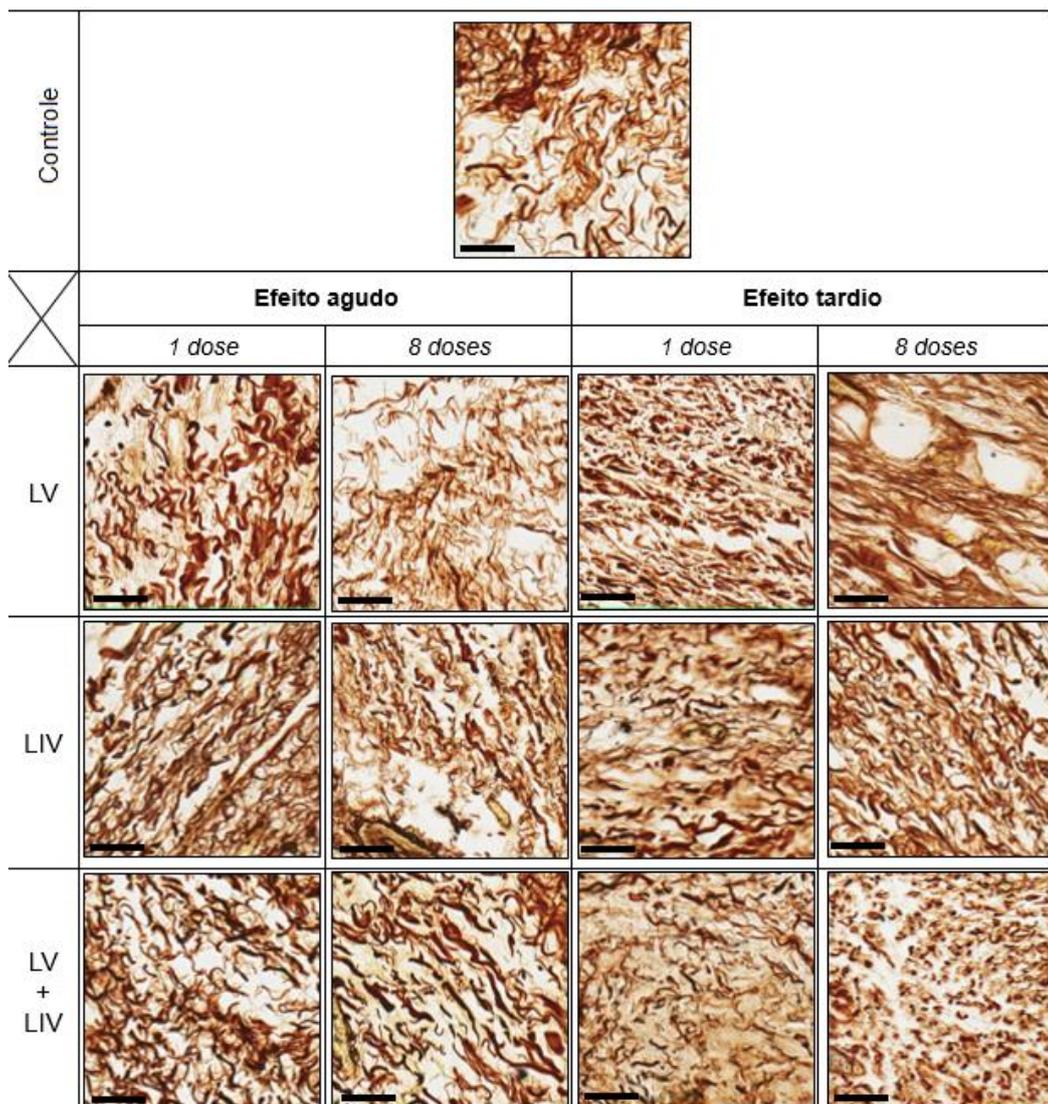
**Tabela 15** Efeito agudo e tardio da aplicação de 1 e 8 doses dos LBP na integridade e justaposição das fibras musculares das pregas vocais de suínos.

Total de doses	Tratamento	Efeito	Mediana	Teste estatístico valor de p
0	Controle	-	2,0	Kruskal-Wallis p > 0,05
1	LV	Agudo	2,0	
	LIV		2,0	
	LV +LIV		2,0	
1	LV	Tardio	2,0	
	LIV		3,0	
	LV+LIV		2,0	
8	LV	Agudo	2,0	
	LIV		2,0	
	LV +LIV		2,0	
8	LV	Tardio	2,2	
	LIV		3,0	
	LV+LIV		2,0	

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho.



**Figura 30.** Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses na expressão das fibras reticulares associadas às fibras musculares estriadas ( $4 \times 200 \mu\text{m}^2$ ) das pregas vocais (justaposição/integridade) de suínos. A expressão das fibras reticulares associadas ao endomísio das fibras musculares não diferiu entre os grupos, controle ou tratados com LV, LIV ou LV+LIV, para 1 ou 8 doses e mesmo para o efeito agudo ou tardio (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.



**Figura 31.** Fotomicrografias representativas da integridade/justaposição das fibras musculares estriadas das pregas vocais da laringe de suínos, avaliadas pela expressão das fibras reticulares (preto). Não houve diferença entre os grupos, controle ou experimentais (LV, LIV, LV+LIV, 1 ou 8 doses). Coloração: impregnação argêntica (reticulina). Barra de aumento = 25  $\mu$ m.

#### 4.3.3.5. Intensidade das fibras nervosas associadas ao músculo estriado

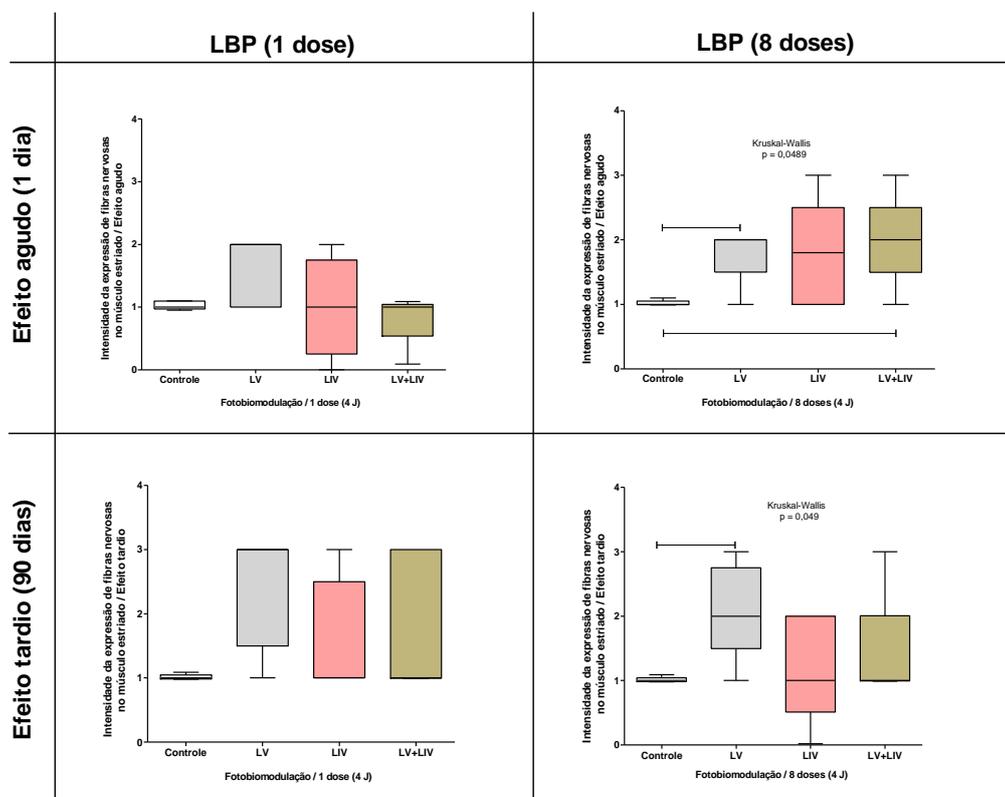
O efeito dos LBPs na expressão das fibras nervosas associadas ao músculo estriado está mostrado na tabela 16 e nas figuras 32 e 33.

Os resultados mostraram que 1 dose dos lasers não afetaram a expressão de fibras nervosas associadas ao músculo estriado das pregas vocais, de forma aguda ou tardia, comparado ao controle ou entre os LBPs (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ). De forma aguda, 8 doses do LV ou LV+LIV aumentaram e, tardiamente, o LV aumentou a expressão de fibras nervosas, na comparação com o grupo controle (Kruskal-Wallis + Dunn,  $p < 0,05$ ).

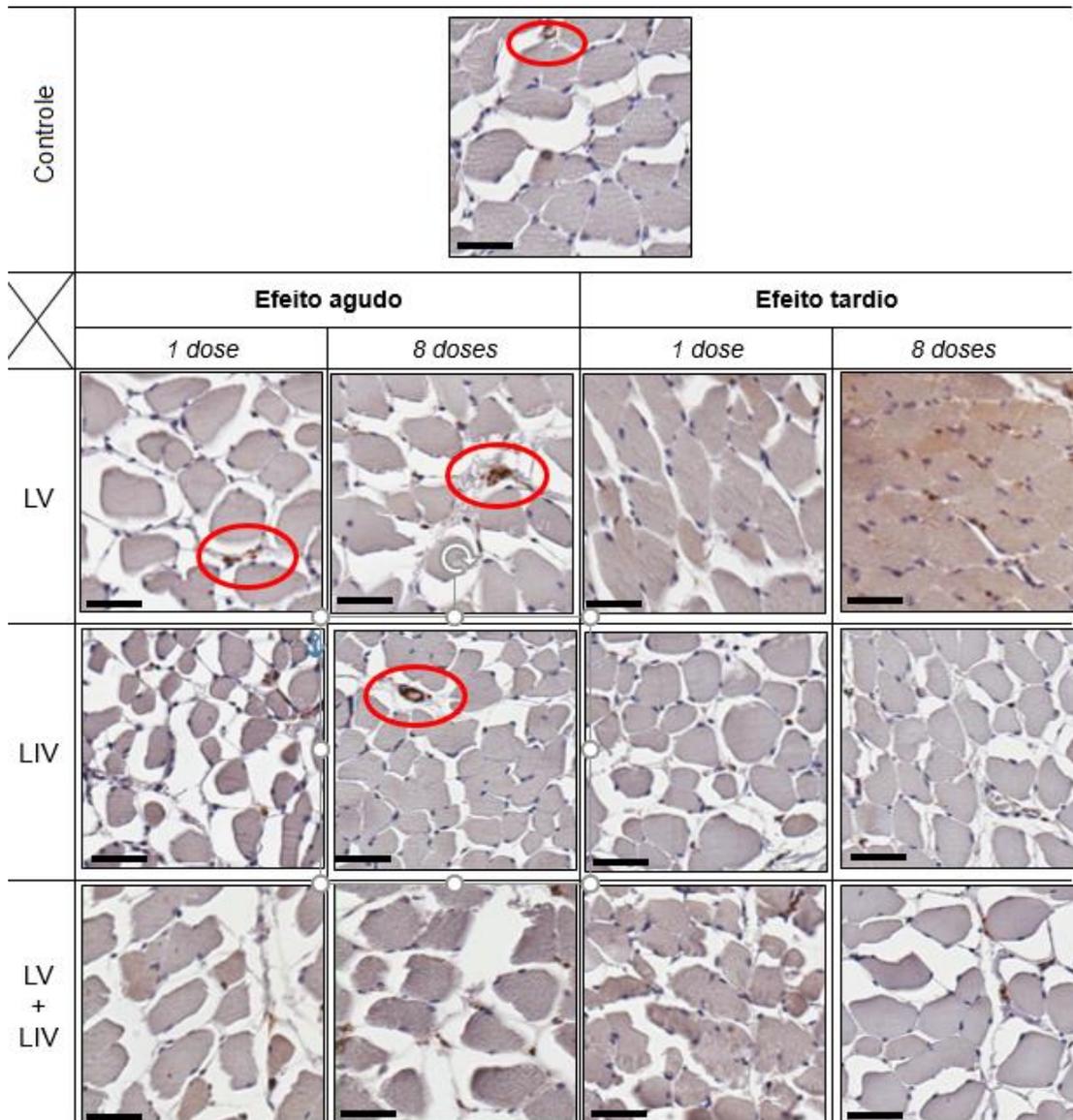
**Tabela 16.** Efeito agudo e tardio de 1 e 8 doses dos LBP da expressão de fibras nervosas associadas ao músculo estriado da prega vocal da laringe de suínos.

Total de doses	Tratamento	Efeito	Mediana	Teste estatístico valor de p
0	Controle	-	1,0***	
1	LV	Agudo	2,0	Kruskal-Wallis p > 0,05
	LIV		1,0	
	LV +LIV		1,0	
1	LV	Tardio	3,0	
	LIV		1,0	
	LV+LIV		1,0	
8	LV	Agudo	2,0*	Kruskal-Wallis p < 0,05
	LIV		1,8	
	LV +LIV		2,0*	
8	LV	Tardio	2,0*	
	LIV		1,0	
	LV+LIV		1,0	

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho. Os \* indicam os pares com diferença estatística.



**Figura 32.** Efeito agudo e tardio de 1 ou 8 doses dos LBP na expressão de fibras nervosas associadas ao músculo estriado das pregas vocais de suínos (4 x 200 µm<sup>2</sup>). A dose única dos LBP, não afetaram a expressão, aguda ou tardia, de fibras nervosas, comparado ao controle ou entre os lasers (Kruskal-Wallis, p > 0,05). Aguda e tardiamente, 8 doses do LV ou LV+LIV e LV, aumentaram a expressão das fibras nervosas comparado ao controle, respectivamente (Kruskal-Wallis, p < 0,05). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.



**Figura 33.** Fotomicrografias representativas da expressão das fibras nervosas associadas ao músculo estriado das pregas vocais dos grupos controle ou experimentais. Os círculos vermelhos indicam as fibras nervosas marcadas em cor marrom. Coloração: imuno-histoquímica para a proteína S100. Barra de aumento = 25  $\mu$ m.

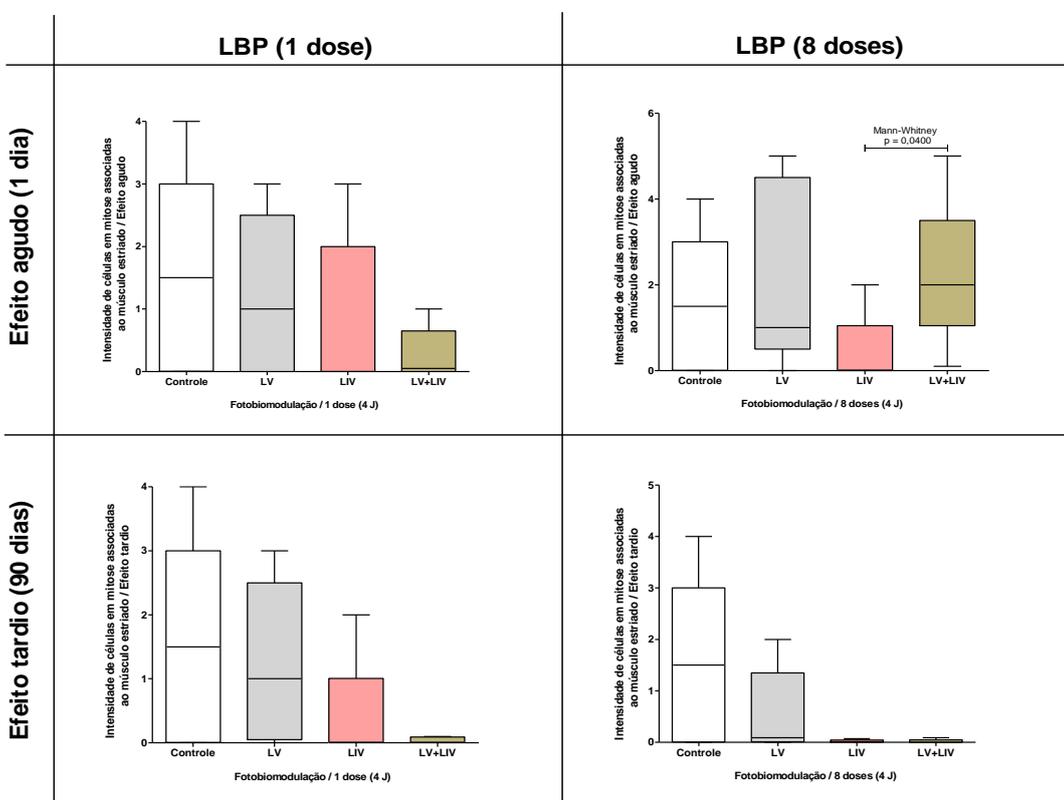
#### 4.3.3.6. Intensidade de células em mitose associadas ao músculo estriado

Os resultados mostraram que o efeito agudo e tardio de 1 dose ou tardio de 8 doses dos LBPs (LV, LIV, LV+LIV), não afetaram o total de células em mitose associadas ao músculo estriado das pregas vocais, quando comparado ao controle ou entre os tratamentos (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ). No entanto, de forma aguda, 8 doses os lasers combinados (LV+LIV) aumentaram o total de células em mitose na comparação com o LIV (Mann-Whitney,  $p = 0,040$ ) (Ver tabela 17 e na figura 34).

**Tabela 17.** Efeito agudo e tardio da aplicação de 1 e 8 doses dos LBP's no total de células em mitose associadas ao músculo estriado das pregas vocais de suínos.

Total de doses	Tratamento	Efeito	Mediana	Teste estatístico valor de p
0	Controle	-	1,5	Kruskal-Wallis p > 0,05
1	LV LIV LV+LIV	Agudo	1,0 0,0 0,1	
	LV LIV LV+LIV	Tardio	1,0 0,0 0,0	
	LV LIV LV+LIV	Agudo	1,0 0,0* 2,0*	
8	LV LIV LV+LIV	Agudo	1,0 0,0* 2,0*	Mann-Whitney p = 0,040
	LV LIV LV+LIV	Tardio	0,1 0,0 0,0	Kruskal-Wallis p > 0,05

LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho. Os \* indicam os pares com diferença estatística



**Figura 34.** Efeito e tardio de 1 ou 8 doses no total de células em mitose associadas ao músculo estriado das pregas vocais de suínos, tratados com LV, LIV ou LV+LIV. O efeito agudo e tardio de 1 dose ou tardio com 8 doses dos 3 LBP's, não afetaram o total de células em mitose, comparado ao controle ou entre os tratamentos (Kruskal-Wallis, p > 0,05), mas o LV+LIV, de forma aguda, aumentou as células em mitose na comparação com o LIV (Mann-Whitney, p = 0,040). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.

#### 4.4. Sumário dos resultados

Tabela 18. Sumário dos resultados

Termografia	Idade e doses dos LBP	C	LV	LIV	LV +LIV	LV	LIV	LV +LIV	Teste estatístico (valor de p)	
			Temperatura antes do LBP (°C)			Temperatura depois do LBP (°C)				
			Jovem (1)	Adulto (1)	Jovem (8)	Adulto (8)	Jovem (1)	Adulto (1)		Jovem (8)
			36±2*	37±1*	37±1	37±2	38±1	37±1	37±2	AN+SNK, p = 0,032
			31±2	32±2	32±3	32±2	32±2	32 ±3	32±2	AN+SNK, p > 0,05
			36±2	36±2*; 36	35±1*; 35	36±1*; 36	37±1*; 36	36±1*; 36	37±1*; 37	AN ou KW (p < 0,05); TP (p<0,05)
			31±2*	32±2; 31	33±2*; 33	32±2; 32*	32±2; 32	34±1*; 34	32±2; 33*	
Análises histológicas	LBP (doses)	C	LV	LIV	LV +LIV	LV	LIV	LV +LIV	-	
			Efeito agudo			Efeito tardio				
Largura da mucosa	1	2±0*****	2±1	1±0**	1±0*	1±0*	1±0	1±0*	AN+SNK; p < 0,01	
	8		1±0*	1±0*	0,8±0*	1,0±0,5	0,9±0,4	1±0*		
Total fibroblastos/fibrócitos	1	21±3; 21±3 ****	21±2	20±3	22±8	19±2*	19±2*	25±1*	AN+SNK (p = 0,0028 e p = 0,0029)	
	8		19±2	21±5	20±3	22±5*	21±2*	15±3***		
Intensidade das fibras colágenas	1	2±1**; 2*	2±1; 1	2±1; 2	1±1; 1	1±1; 1	1±0; 1	1±0; 1	KW+D (p > 0,01)	
	8		2±1; 2	3±1*; 3	1±1*; 1	2±0,5; 2*	2±1; 2	2±1; 2**	AN+SNK; KW+D (p < 0,01)	
Intensidade das fibras elásticas	1	3±1; 3*	3±0; 3	2±0	2±0; 2	3±1; 2	2±1; 2	2±1; 1	AN+SNK (p > 0,01)	
	8		1±1; 1	2±1*; 2	2±1*; 2	2±1; 3	2±1; 1	1±1; 1*	AN+SNK (p = 0,033); MW (p = 0,031)	
Intensidade das fibras nevasas (mucosa)	1	1*	2	2	2	2	1	2	KW+D (p > 0,01)	
	8		3	2	2	3*	2	2	KW+D (p = 0,049)	
Intensidade células em mitose (mucosa)	1	2*	3	4	3	1	3	1	KW+D (p = 0,033); MW (p = 0,030)	
	8		1	1**	4*	6*	0	1*		
Tecido conjuntivo qualitativo	1	Edema	Normal			Edema			Inf. inflamatório (-); lesão epitelial (-)	
	8		Edema			Normal	Edema	Normal		
Total de fibras musculares estriadas	1	33±2	20±6*	30±6*	32±6**	37±5	35±7	32±4	AN+SNK (p = 0,033); AN+SNK (p > 0,01)	
	8		27±6	27±3	30±7	32±3	29±3	34±7		
Total de mionúcleos	1	31±3***; 31±3; 31*	39±7; 37	36±2; 36	39±10; 39	50±5*; 49	43±7*; 44	42±3*; 42	AN+SNK (p > 0,01); AN+SNK (p < 0,001); AN+SNK (p = 0,0035); KW+D (p = 0,049)	
	8		41±7; 38*	35±2; 35	34±7; 32	41±3*; 41	41±9**; 42	34±6*; 32		
Área das fibras musculares estriadas	1	28±5** 28*****	43±13**; 42	45±16***; 46	31±9*; 31	26±8*; 27	33±10**; 32	31±7*; 30	AN+SNK (p < 0,001)	
	8		34±10; 32*	34±8; 32*	33±7; 32*	32±7; 31	34±6; 33*	33±8; 33*	KW+D (p < 0,001)	
Integridade / Justaposição das fibras musculares	1	2	2	2	2	2	3	2	KW+D (p > 0,01)	
	8		2	2	2	2	3	2		
Intensidade das fibras nevasas (músculo estriado)	1	1***; 1	2	1	1	3	1	1	KW+D (p > 0,01); KW+D (p < 0,05); KW+D (p < 0,05)	
	8		2	2	2*	2*	1	1		
Intensidade de células em Mitose (músculo estriado)	1	2	1	0	0	0	0	0	KW+D (p > 0,01); MW (p = 0,040)	
	8		1	0*	2*	0	0	0		

AN+SNK: ANOVA + Student-Newman-Keuls; KW+D: Kruskal-Wallis + Dunn; tp: teste t pareado; W: Wilcoxon; MW: Mann-Whitney

## **5. DISCUSSÃO**

Na Fonoaudiologia, por escassez de estudos científicos na área de voz, tem-se utilizado direcionadores clínicos baseados nas publicações de outras áreas da saúde, principalmente Odontologia, Fisioterapia e Dermatologia, por meio de inferências. Sabe-se que as pregas vocais têm uma estrutura de corpo-cobertura (mucosa, lâmina própria e músculo) muito específica e com comportamentos bem diferentes de outras estruturas musculares do corpo, isso gera insegurança no momento da escolha da dose e tipo de laser que se deve utilizar, pois não se sabia, ao certo, o impacto histológico que o LBP poderia, de fato, causar na laringe em curto e/ou longo prazo (efeito agudo e efeito tardio).

Em 2013, Marinho et al. analisaram o efeito protetor das terapias únicas e combinadas com laser de baixa potência nas doses de 2,1J e 2,1+1,2J com tempo total de irradiação de 30s e 30+30s, na laringite de refluxo por complicação clínica da intubação nasogástrica induzida em ratos Wistar. O estudo mostrou que houve redução na atividade da mieloperoxidase e diminuição da gravidade da resposta inflamatória, além de melhora no tecido de granulação no grupo que recebeu o tratamento combinado e sequencial de laser de baixa potência. A quantidade de mastócitos reduziu nos grupos sem tratamento e no grupo que recebeu dose única do tratamento. O grupo que recebeu tratamento combinado e sequencial também apresentou melhor padrão de colagenização. Os autores concluíram que a terapia combinada (780nm e 660nm) modulou com sucesso a resposta inflamatória e a colagenização em modelo experimental na laringite de refluxo por complicação clínica da intubação nasogástrica.

Em 2014, Marinho et al. realizou outro estudo com o objetivo de analisar os efeitos da laserterapia em um modelo de laringite induzida por refluxo. O estudo foi feito com ratos Wistar divididos em grupo controle (sem intubação) e grupo com intubação nasogástrica e grupo com intubação nasogástrica e com terapia de laser. A irradiação do LBP foi feita em região laríngea, comprimento de onda 780nm, 3 pontos, 4 sessões, intervalo de 48h, 4,2J por ponto. O estudo mostrou que o LBP melhora a resposta inflamatória e a colagenização no modelo de laringite induzida por refluxo em roedores. O LBP, nesse protocolo, acelerou o desenvolvimento de tecido de granulação, considerado um importante evento biológico associado ao processo de cicatrização. Tecido de granulação é

um tecido úmido granulado vermelho ou rosa composto de vasos sanguíneos novos, tecido conjuntivo, fibroblastos e células inflamatórias.

A causa mais comum de laringite é a doença do refluxo laringofaríngeo. Os sintomas da laringite podem ser rouquidão, globus, tosse crônica, fadiga vocal, dor de garganta e disfagia (Zois et al. 2007). E isso também é observado na prática clínica com profissionais da voz. Muitos apresentam a doença do refluxo laringofaríngeo. Diante disto, os estudos de Marinho et al. (2013, 2014) foram utilizados como direcionadores para a elaboração do projeto da presente pesquisa.

Nesta discussão serão apresentadas as análises encontradas neste estudo e comparadas com os achados da literatura. O suíno foi selecionado para essa pesquisa por ter algumas semelhanças ao ser comparado com os seres humanos, o que pode permitir algumas translações e inferências para a prática clínica, na área de voz, na Fonoaudiologia.

O porco, assim como o ser humano, é um animal homeotérmico (Alves et al. 2023), ou seja, capaz de regular a temperatura corporal, apesar da temperatura do ambiente. Além disso, por uma perspectiva estrutural, um estudo mostrou que os porcos têm pregas vocais com dimensões, comprimento e propriedades mecânicas similares às dos seres humanos. O esqueleto laríngeo do porco aproxima-se do esqueleto laríngeo humano, com três cartilagens únicas, a epiglote, a tireoide e a cricoide e duas pares, as corniculadas e aritenoides. Contudo, a lâmina própria do homem adulto difere da lâmina própria do suíno, que possui duas camadas pouco diferenciadas, a camada superficial, com predomínio de fibras elásticas e a camada profunda, com o predomínio de fibras colágenas (Leão et al. 2010).

### **5.1. Efeito do LBP na temperatura da laringe de suínos**

Na terapia vocal também é possível observar o que aconteceu neste estudo, como efeito adverso ou reações adversas, tais como o eritema. Conforme foi observado durante esta pesquisa na pele de suínos, relatos de casos clínicos mostraram essa mesma reação com pacientes em início de tratamento com LBP. Todavia, após algumas sessões, essas reações deixam de acontecer e os benefícios do LBP podem ser relatados. Provavelmente, o eritema com os suínos,

assim como em humanos, ocorreu após o LBP devido à sua interação com a pele. Quando o laser é aplicado na pele, ele emite uma energia que é absorvida pelos tecidos. Esta absorção de energia pode causar o aquecimento dos tecidos e provocar uma resposta inflamatória, resultando em vermelhidão da pele. Além disso, o LBP pode provocar a dilatação dos vasos sanguíneos na área tratada. Isto acontece devido à estimulação da produção de óxido nítrico, que é uma substância que dilata os vasos sanguíneos. A dilatação dos vasos sanguíneos produz aumento do fluxo sanguíneo na região e pode ocasionar o eritema. No entanto, vale ressaltar que o eritema causado pelo LBP é geralmente temporário e desaparece em poucos dias (Avci et al. 2013). Contudo, se a reação persistir ou se tornar mais intensa, como queimaduras ou irritação da pele, é importante considerar o tratamento com LBP como evidência terapêutica negativa.

A temperatura da pele de suínos adultos pode variar em condições normais, mas geralmente está em torno da temperatura corporal normal para mamíferos, que é de aproximadamente 38 a 39 graus Celsius. Porém, diferentes partes do corpo podem ter temperaturas diferentes (Alves et al. 2023). É importante mencionar que existem algumas partes do corpo consideradas partes quentes ou frias (Roberto & Souza, 2014) e a laringe é classificada como uma região fria (Zhang et al. 2021), ou seja, com a temperatura com alguns graus abaixo da temperatura do corpo.

Os resultados desta pesquisa mostraram que há variação, manutenção, aumento ou diminuição da temperatura após a aplicação de dose única e doses múltiplas de LBP, vermelho e infravermelho, isolados ou em combinação, nos tecidos da laringe de suínos in vivo, por meio de análise fototermográfica. Antes do tratamento, a temperatura média da laringe dos animais adultos foi de  $31,2 \pm 2,0$  °C e, após o último dia de tratamento, a temperatura média foi de  $32,45 \pm 1,8$  °C. Em suínos jovens, a temperatura média na laringe foi de  $35,7 \pm 1,7$  °C antes do tratamento e após o último dia de tratamento foi de  $36,7 \pm 1,05$  °C. De acordo com Alves et al. (2013), pode-se destacar que a mesma luz em diferentes doses e em animais com diferentes idades e composições corporais pode afetar a temperatura de forma diferente. A temperatura corporal pode variar em função de fatores como a idade do animal, o ambiente em que se encontra e o seu estado geral de saúde. Neste estudo, a temperatura média da laringe dos suínos jovens

era 12% mais elevada do que a temperatura média dos suínos adultos antes do tratamento com LBP.

A mudança de temperatura pode ocorrer devido a uma alteração no fluxo sanguíneo e a outros processos termorreguladores (Charkoudian 2003; Gómez-Prado et al. 2022; Mota-Rojas et al. 2022) e a termografia, utilizada nesta investigação, pode detectar problemas de saúde precocemente e também identificar problemas como inflamação, infecções, lesões ou microlesões (Sivachenko et al, 1988; Tattersall 2016). Além disso, também pode ser útil para avaliar a eficácia das técnicas de reabilitação e monitorar o progresso do tratamento. Essa técnica pode ser usada para analisar o padrão de aquecimento e resfriamento/desaquecimento da laringe e da região do trato vocal durante a produção vocal e/ou uso de recursos terapêuticos e pode fornecer informações importantes sobre a saúde e o funcionamento das estruturas envolvidas na produção da voz (Broaddus-Lawrence et al. 2000; Fogaça et al. 2006; Schneider & Sataloff, 2007).

A temperatura natural da laringe humana pode variar entre indivíduos, mas geralmente fica em torno de 36 a 37 graus Celsius, que é a temperatura corporal considerada normal (Charkoudian, 2003). No entanto, durante a produção vocal, seja na fala ou no canto, ocorrem diversos processos fisiológicos que podem gerar alterações térmicas na região da laringe, devido ao aumento do fluxo sanguíneo e do metabolismo local (Broaddus-Lawrence et al. 2000; Fogaça et al. 2006; Schneider & Sataloff, 2007; Mello & Silva, 2008).

O suíno, tal como o ser humano, é um animal homeotérmico (Alves *et al.* 2023), ou seja, capaz de regular a sua temperatura corporal, independentemente da temperatura do meio ambiente. Além disso, do ponto de vista estrutural, um estudo demonstrou que os suínos possuem pregas vocais com dimensões, comprimento e propriedades mecânicas semelhantes às dos humanos (Leão *et al.* 2010).

Este estudo mostrou o efeito termorregulador do laser como uma resposta aguda a 1 e 8 doses de LBP na laringe de suínos. Os resultados mostraram que a temperatura na laringe dos animais jovens é maior do que a temperatura na laringe dos animais adultos antes da aplicação do laser de baixa potência. Além

disso não houve diferença entre as temperaturas da laringe antes e após os diferentes lasers LV, LIV ou LV+LIV nos animais adultos com 1 dose.

A temperatura da laringe aumentou, nos animais jovens com 1 dose, apenas no LV. Não houve variação na média+DP da temperatura antes da aplicação do LBP nos animais jovens, sendo a maior no segundo dia e a menor no sexto dia. Houve variação na mediana da temperatura na laringe dos animais jovens após a aplicação do LV, sendo a maior após o segundo dia e a menor do sexto ao oitavo dia. Não houve variação da temperatura nos animais jovens nas aplicações das 8 doses do LIV, contudo a temperatura da laringe aumentou nos animais jovens após aplicação LV+LIV, nas múltiplas doses.

Não foi observada variação na temperatura da laringe, durante os 8 dias do ensaio, para os animais jovens de todos os grupos, antes da intervenção e depois das múltiplas doses do LV, nas análises individuais, mas a temperatura da laringe dos animais jovens aumentou após as aplicações múltiplas do LV+LIV, sendo esta maior do que observada em LV e LIV quando comparados. Houve variação na temperatura da laringe dos animais adultos antes da aplicação múltipla do LV, sendo a maior ao terceiro dia e a menor ao sétimo dia. E, após a aplicação múltipla do LV não houve diferença entre as temperaturas. No conjunto, a temperatura da laringe também não diferiu após as múltiplas doses nesses animais.

Não houve diferença entre as temperaturas da laringe de suínos adultos antes e após cada dia de aplicação do LIV. Contudo houve aumento na temperatura após as múltiplas aplicações do LIV. A temperatura da laringe no grupo de animais adultos aumentou após a aplicação múltipla de LV+LIV e houve diferença entre as temperaturas antes e após o LV+LIV.

Piva et al. (2011) demonstraram em um estudo que a terapia com laser de baixa intensidade induz a vasodilatação, aumentando, imediatamente, o fluxo capilar e a perfusão tecidual em indivíduos saudáveis e depende do comprimento de onda utilizado e modificado pela temperatura da pele. Esses achados estão relacionados a parâmetros fisiológicos associados à sensibilidade ou resistência à LBP. Os autores afirmam que há um aumento do fluxo microcirculatório durante a irradiação com o laser infravermelho e não há variação com a irradiação com o laser vermelho e que essas alterações ou não na temperatura estão relacionadas

com a temperatura da pele antes da aplicação. Existe uma diferença entre a temperatura de regiões do corpo entre os indivíduos e algumas regiões são consideradas frias ou quentes e são parâmetros individuais.

Durante a fonação, função motora dos músculos e fibras, é natural que ocorram microlesões e inflamações, que, por sua vez, causam sintomas vocais em decorrência de traumas mecânicos devido ao uso da voz por um determinado período de tempo. Esse processo inflamatório pode se apresentar de diferentes formas, porém, considerando um período prolongado de uso da voz, o mais comum é o aparecimento de edema, ou seja, acúmulo de líquido nas pregas vocais e fadiga vocal (Timbie et al. 2012; Behlau; Carroll, 2022). Na prática clínica, o tratamento da fadiga vocal vai desde a redução do esforço fonatório até exercícios e orientações de higiene vocal, que reduzem a resposta inflamatória (Murad, 2017; Behlau et al. 2022). Quando um processo inflamatório é desencadeado, o tratamento busca a reparação tecidual para manter a funcionalidade muscular. A inflamação do tecido laríngeo, incluindo as pregas vocais, impede a livre vibração da mucosa, o que altera a qualidade da voz. Nesse sentido, qualquer ação que promova a otimização dessa drenagem e acelere o processo inflamatório, teoricamente, pode trazer benefícios importantes (Ferreira et al. 2010).

O LBP, quando aplicado na região da laringe, pode ajudar a reduzir a inflamação laríngea causada pelos efeitos da fonação, promover a cicatrização dos tecidos e aliviar a dor. Além disso, pode estimular a circulação sanguínea local e pode aumentar a temperatura local devido ao efeito térmico do laser. No entanto, vale ressaltar que ainda são poucos (2) os estudos que descrevem e utilizam a termografia e a laserterapia na área da voz (Behlau et al. 2022).

Neste estudo, foi possível verificar o efeito termorregulador do laser como efeito agudo de 1 e 8 doses no protocolo utilizado na laringe de suínos. Isso pode ser um direcionador clínico para o uso do LBP em humanos. Este estudo teve como objetivo avaliar a temperatura antes e após a aplicação em dose única e em doses múltiplas (8 doses) do laser vermelho e infravermelho LBP, isoladamente ou em combinação, nos tecidos laríngeos de suínos.

## **5.2. Efeito do laser de baixa potência nos tecidos da laringe de suínos**

Como os métodos de coloração requerem uma boa fixação do tecido que depende de algumas variáveis, tais como temperatura, espessura do tecido, penetração, tempo de fixação, escolha do fixador, relação do volume fixador/tamanho do espécime, estocagem apropriada, pH do fixador, osmolaridade da solução fixadora, adição de sais na mistura e concentração dos fixadores, algumas lâminas e materiais foram perdidos durante a realização desta pesquisa.

Foi possível observar diferentes efeitos agudos e tardios após a aplicação do laser de baixa potência, com diferença nos achados dependendo da dose e do comprimento de onda utilizado.

Acerca da mucosa da prega vocal, os resultados mostraram redução nas larguras nos suínos jovens e adultos,

Com relação à largura da mucosa associada à prega vocal de suínos, como efeito agudo verificou-se uma redução na largura após a aplicação de uma única dose de laser infravermelho (LIV) e LV+LIV comparados ao controle e redução após o LV quando comparado à combinação do laser vermelho e infravermelho (LV+LIV). Com oito doses, todas as aplicações (LV, LIV e LV+LIV) demonstraram uma diminuição consistente na largura da mucosa da laringe. Entretanto, não foram identificadas diferenças significativas entre as aplicações para essa dosagem. Em relação ao efeito tardio, houve uma redução observada na largura da mucosa da laringe após a aplicação de uma dose única de laser infravermelho (LIV) e da combinação do laser vermelho e infravermelho (LV+LIV). Adicionalmente, após oito doses de todas as aplicações (LV, LIV e LV+LIV) demonstraram uma redução consistente na largura da mucosa da laringe. Não foi observada diferença significativa entre as aplicações para essa dosagem.

A diminuição da largura da mucosa observada neste estudo sugere a redução de edema e de possíveis processos inflamatórios causados pela fonação contínua do suíno. O laser de baixa potência vem sendo estudado e referido por seus efeitos anti-inflamatórios, devido à redução da inflamação por estímulos de reabsorção de exudatos e eliminação de substâncias alógenas, pode haver interação na síntese de prostaglandinas, interferência na microcirculação, redução do consumo de oxigênio e glicose nas células. O laser promove um efeito

antiedematoso devido ao aumento da microcirculação, que beneficia a drenagem do plasma e provável ação fibrinolítica (Gomes & Schapochnik 2017). Estudos trazem que tanto o laser infravermelho (Muñoz et al. 2013; Alves et al. 2014; Andrade & Villalpando 2015; Coca et al. 2016), quanto o laser vermelho (Alves et al. 2014), podem reduzir edema e que devem ser associados com a terapia miofuncional e que cada laser terá uma ação diferente a depender do tecido que ele estará irradiando.

Com o uso do laser infravermelho, pode acontecer a redução de edema e melhora do trofismo muscular, associado aos exercícios miofuncionais (Andrade & Villalpando 2015) e, além de favorecer a eliminação do edema pode ser utilizado em gânglios linfáticos axilares facilitando as manobras de esvaziamento da mama (Coca et al., 2016), minimizar o trofismo muscular e reduzir a parestesia. O laser vermelho para promover a analgesia e redução de edema (Alves et al. 2014). Neste estudo foi observada redução da largura da mucosa tanto no laser vermelho quanto em 8 doses efeito agudo e tardio, como no infravermelho e nos dois lasers combinados vermelho e infravermelho em 1 e 8 doses, efeito agudo e tardio.

Observou-se, nesta pesquisa, com relação ao número de fibroblastos, no tecido conjuntivo da laringe de suínos, que não houve variação no número de fibroblastos/fibrócitos nas aplicações dos LPBs (LV, LIV, LV+LIV) quando comparado ao grupo controle ou entre eles, no efeito agudo ou tardio com 1 dose. Contudo houve diminuição no número de fibroblastos/fibrócitos no LV ou no LIV, no efeito tardio de 1 dose, na comparação com o grupo controle. O número de fibroblastos/fibrócitos foi menor com as múltiplas doses dos lasers combinados (LV+LIV), comparados ao controle e aos grupos tratados com LV ou LIV.

Apesar de haver evidência científica de que o laser de baixa intensidade, em certos parâmetros, promove um efeito bioestimulador nas células reticulares fibroblásticas, ainda há dúvidas quanto à dependência do estado fisiológico das células. Um estudo feito com queloides humanos revelou que o estado fisiológico das células afeta os resultados do efeito do laser de baixa potência e que as células de alta taxa metabólica e ciclo celular curto não respondem ao tratamento com laser. Com dose de 3J reduziu significativamente a morte celular, mas não estimulou o ciclo celular. Mas com dose de 21J os efeitos foram negativos nas

células, pois aumentou a morte celular e inibiu a proliferação celular (Frigo et al. 2010). Na presente pesquisa, com o laser vermelho ou laser infravermelho 1 dose de 4J o efeito tardio foi a diminuição do número de fibroblastos e com a combinação do vermelho e infravermelho também reduziu. Com 8 doses de 4J cada, em 8 dias consecutivos, observou-se diminuição do número de fibroblastos com o laser vermelho ou vermelho e combinados. Portanto, o terapeuta deve decidir a dose e o tipo de laser baseado no objetivo terapêutico.

Na análise da intensidade da expressão das fibras colágenas (colágeno tipo I) no tecido conjuntivo da laringe de suínos após a aplicação do laser de baixa potência, observou-se aumento na intensidade das fibras colágenas na aplicação do laser infravermelho e a aplicação combinada do laser vermelho e diminuição na aplicação do infravermelho como efeito agudo de 8 doses. Como efeito tardio, após oito doses de aplicação, observou-se um aumento na intensidade da expressão das fibras colágenas em todas as aplicações (LV, LIV e LV+LIV). Se o objetivo terapêutico for o aumento de fibras colágenas pode-se sugerir para efeito agudo o laser infravermelho ou a combinação do laser vermelho e infravermelho 8 doses de 4J e, para o efeito tardio, os três lasers (LV, LIV e LV+LIV), 8 doses de 4J. Se o objetivo for a reorganizar da deposição de fibras colágenas, para promover a regeneração do tecido, sem cicatriz, provavelmente, o comprimento de onda mais indicado, no efeito agudo, sejam múltiplas aplicações do infravermelho, nesse tratamento proposto. E no efeito tardio sejam múltiplas aplicações do LV+LIV.

Com relação às fibras do sistema elástico, observou-se ausência de variação no efeito agudo com dose do LV, LIV ou LV+LIV, aumento da intensidade das fibras elásticas no efeito agudo com as múltiplas doses do LIV na comparação com LV+LIV. Ausência de variação da intensidade no efeito tardio dose única LV, LIV, LV+LIV e aumentou da intensidade no efeito tardio múltiplas doses no LIV quando comparado ao LV+LIV. Se o objetivo terapêutico for o aumento das fibras elásticas, pode-se sugerir como tratamento, tendo melhor efeito agudo ou tardio, 8 doses de 4J do laser infravermelho.

Na intensidade das fibras nervosas na mucosa foi observado o aumento como resultado do efeito tardio após 8 doses da aplicação do laser vermelho em comparação ao grupo controle. Se o objetivo terapêutico for o aumento das fibras

nervosas, pode-se sugerir como melhor tratamento 8 doses de 4J de laser vermelho, como efeito tardio.

Na observação da intensidade das células em mitose associadas à mucosa, houve aumento do total de células nas múltiplas aplicações de LV+LIV, comparado ao controle e ao LIV, no efeito agudo e aumentou do total de células em mitose no LV em comparação ao LV+LIV, no efeito tardio múltiplas doses. Se o objetivo terapêutico for o aumento de células em mitose na mucosa, pode-se sugerir como melhor tratamento no efeito agudo múltiplas aplicações de 4J de LV+LIV e no efeito tardio, múltiplas aplicações de 4J do laser vermelho.

Na avaliação qualitativa do tecido conjuntivo sobre o efeito do LBP, foi possível observar edema intersticial nas mucosas do grupo controle e dos animais tratados com 8 doses dos três LBPs (LV, LIV, LV+LIV, efeito agudo, também nos animais tratados com 1 dose do LV, efeito agudo, edema na mucosa com a dose única do LV, LIV e LV+LIV, efeito tardio. E ainda, edema nas múltiplas doses do LIV efeito tardio. Contrariamente, nas múltiplas doses do LV ou LV+LIV, efeito tardio não foram observados edemas. As células migratórias (leucócitos) apresentaram-se mais esparsas na mucosa profunda e mais expressivas na mucosa superficial. Contudo nenhum dos tratamentos com LBPs ou o grupo controle apresentaram infiltrados inflamatórios.

No tecido muscular estriado, observou-se diminuição no total de fibras musculares estriadas no efeito agudo com a dose única do LV e LIV, comparados com LV+LIV, não houve diferença entre os LBPs e o grupo controle no efeito agudo com a dose única. E ausência de diferença entre os grupos para o efeito tardio da dose única ou, agudo e tardio, para as múltiplas doses.

Neste estudo verificou-se aumento no total de mionúcleos no efeito agudo com 8 doses do LV na comparação com o grupo controle, mas não com os demais LBPs. Além disso, aumento com LV, LIV ou LV+LIV no efeito tardio 1 dose comparados ao controle e no efeito tardio 8 doses de LIV, comparado com o LV ou LV+LIV. Os mionúcleos são núcleos adicionais encontrados dentro das fibras musculares. O aumento de mionúcleos, conhecido como hipertrofia mionuclear, ocorre em resposta ao treinamento de resistência e ao crescimento muscular. Quando um músculo é submetido a um estresse intenso, como o levantamento de peso, ocorrem danos nas fibras musculares. Como parte do

processo de reparo e crescimento muscular, as células musculares ativam células satélites para se fundirem às fibras musculares existentes, contribuindo com seus núcleos adicionais. Isso aumenta a capacidade da fibra muscular de sintetizar proteínas e, conseqüentemente, promove o crescimento muscular. Em resumo, o aumento de mionúcleos é um mecanismo adaptativo do corpo em resposta ao treinamento de resistência para promover o crescimento muscular (Gondin et al. 2006; Garanhani et al. 2007).

Com relação à área das fibras musculares aumentou a área das fibras no efeito agudo 1 dose do LV e LIV comparado ao controle, no efeito agudo 1 dose de LIV na comparação com LV ou LV+LIV e no efeito agudo múltiplas doses de LV, LIV e LV+LIV na comparação com o controle. O aumento também foi observado no efeito tardio 1 dose de LV comparado ao controle e com ao LIV e no diâmetro das fibras no efeito tardio, múltiplas doses do LV e LV+LIV comparados ao grupo controle.

Essa variação muscular pode ser justificada por adaptações fisiológicas e/ou metabólicas promovidas pelo LBP. Um estudo realizado para investigar o efeito da terapia com laser de baixa intensidade (LLLIT) nos marcadores de dano muscular e desempenho de força no bíceps braquial, com laser de baixa intensidade (808 nm; 100 mW; 35,7 W/cm<sup>2</sup>, 357,14 J/cm<sup>2</sup> por ponto, energia de 1 J por ponto aplicada por 10s em quatro pontos do ventre do bíceps braquial de cada braço), revelou que houve atenuação da atividade da CK (creatinoquina) 72 horas após a aplicação do laser, mas não teve efeito positivo na recuperação do desempenho de força muscular (Felismino et al. 2014). Nesse sentido pode-se verificar que a regeneração do tecido pode resultar em uma reorganização das fibras musculares existentes. Isso significa que as fibras musculares podem ser substituídas por tecido cicatricial ou por um número reduzido de fibras musculares. Esse processo pode levar à diminuição do total de fibras musculares. Ainda, o uso do laser de baixa potência também pode levar à diminuição do total de fibras musculares devido ao efeito do laser na atividade muscular. O laser pode causar relaxamento ou redução da atividade muscular, o que pode resultar em uma diminuição do número de fibras musculares ativas (Alves et al. 2019). Por isso a dose utilizada é extremamente importante, pois ela determinará se o efeito será de aumento ou redução, estímulo, inibição ou modulação celular. Vale

lembrar que neste estudo a dose utilizada foi de 4J em dose única ou múltiplas (8 doses em dias consecutivos).

Na presente pesquisa não foi observada nenhuma diferença na integridade, justaposição das fibras musculares, após as aplicações do laser de baixa potência. O que mostra um achado importante e positivo com relação ao uso do LBP, visto que a integridade das fibras musculares é importante para o funcionamento eficiente do músculo. Quando as fibras musculares estão bem justapostas, elas podem transmitir força de forma mais eficaz e coordenada. Isso é essencial para a produção de movimento e para o desempenho muscular. Quando ocorre uma lesão muscular, como uma ruptura de fibras musculares, a integridade ou justaposição das fibras musculares fica comprometida, isso pode ocasionar perda de força, função e capacidade do músculo de produzir movimento adequado. A reabilitação de lesões musculares geralmente envolve a restauração da integridade ou justaposição das fibras musculares. Isso pode ser alcançado por meio de terapia física, exercícios específicos para fortalecer as fibras musculares e promover a cicatrização adequada, além de cuidados adequados com a lesão (Gondin et al. 2006; Garanhani et al. 2007).

Com relação à intensidade das fibras nervosas associadas ao músculo estriado das pregas vocais de suínos, não houve variação da expressão de fibras nervosas com 1 dose de forma aguda ou tardia, comparado ao controle ou entre os LBPs. Houve aumento da expressão de fibras nervosas efeito agudo 8 doses do LV ou LV+LIV comparados ao controle e também aumento da expressão de fibras nervosas, efeito tardio 8 doses do LV na comparação com o grupo controle.

Referente à intensidade de células em mitose associadas ao músculo estriado das pregas vocais de suínos não houve variação no total de células em mitose associadas ao músculo estriado das pregas vocais o efeito agudo e tardio de 1 dose ou tardio de 8 doses dos LBPs (LV, LIV, LV+LIV), quando comparados ao controle ou entre os tratamentos. Contudo houve aumento no total de células em mitose no efeito agudo, 8 doses de LV+LIV na comparação com o LIV. A mitose é um processo fundamental para o crescimento, desenvolvimento e reparo dos tecidos do corpo. Durante a mitose, as células se dividem em duas células filhas geneticamente idênticas à célula mãe. Esse processo é importante para a renovação e manutenção dos tecidos. Isso pode ocorrer em resposta a lesões,

irritações ou inflamações na laringe. O aumento das células em mitose pode ser acompanhado por um aumento no número total de células nos tecidos. No tecido conjuntivo da laringe, um aumento na quantidade de células em mitose pode indicar um aumento na atividade de regeneração ou reparo do tecido (Marchi et al. 2012).

Uma revisão da literatura foi realizada para demonstrar a aplicabilidade mais atual da laserterapia de baixa intensidade (LLLT) no tratamento de lesões musculares esqueléticas, abordando diferentes lasers, parâmetros de irradiação e resultados de tratamento em modelos animais. Os 17 artigos criticamente analisados trouxeram como principais efeitos da LLLT a redução do processo inflamatório, a modulação dos fatores de crescimento e dos fatores reguladores miogênicos e o aumento da angiogênese. Os estudos analisados demonstram os efeitos positivos do laser de baixa potência no processo de reparo muscular, que são dependentes da irradiação e dos parâmetros do tratamento. Os achados sugerem que a LLLT é um excelente recurso terapêutico para o tratamento de lesões musculares esqueléticas em curto prazo (Alves et al. 2014). Um estudo avaliou o efeito no tratamento da fascite plantar da fotobiomodulação. Foram comparadas nove doses de laser de baixa potência com saída de 25 W durante três semanas e nove doses de laser de baixa potência com saída de 10W durante três semanas, ambos os grupos receberam a mesma dose total (10J/cm<sup>2</sup>). Foi observada a redução na dor durante as primeiras três semanas e depois os seus níveis de dor permaneceram estáveis por mais 6 meses (Ketz et al. 2024).

A bioestimulação promovida pelo laser de baixa potência ainda não tem comprovação científica robusta, contudo, na literatura os achados sugerem a ocorrência de alguns eventos celulares, tais como, proliferação epitelial, endotelial e fibroblástica, elevada síntese colagênica, diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos movimentação celular dos leucócitos, fibroblastos e células (Chung et al. 2012).

Os comprimentos de onda mais utilizado na Fonoaudiologia são na faixa do vermelho (635–700 nanômetros) e infravermelho próximo (808-1100 nanômetros). O efeito do laser usado na terapia por fotobiomodulação não é térmico e nem ablativo. O laser usado na clínica vocal é de baixa potência, sem efeitos bionegativos sobre o tecido biológico, atuando sobretudo no estímulo à

fisiologia do organismo. O laser é considerado não-ionizante, ou seja, não tem capacidade de ionizar a matéria, pois provoca excitação temporária da matéria, mas não modifica o DNA das células, apenas modifica o metabolismo celular, na estimulação do ATP, promovendo uma modificação bioquímica. O estímulo luminoso é o gatilho para regulação celular (Karu & Kolyakov 2005; Henriques et al. 2010).

Embora os mecanismos celulares associados à fotobiomodulação ainda não sejam cientificamente explicados, a literatura reitera que a absorção do vermelho e do infravermelho ocorra na mitocôndria, mais precisamente na cadeia respiratória, favorecendo a produção de adenosina trifosfato (ATP), a regulação do pH intracelular, a ativação de mecanismos antioxidantes e a recuperação da homeostase celular (Vanin et al. 2017; Leal-Junior et al. 2019). Pesquisas apontam que, resultados positivos com o uso da fotobiomodulação são encontrados nas faixas de comprimento de onda de 655 a 950nm, em uma faixa de dose de energia de 20 a 60J para pequenos grupos musculares e de 60 à 300J para grandes grupos musculares e potência máxima de 200 mW por diodo (LED) (Behlau et al. 2022).

Um estudo de Lou et al. 2019a, foi realizado com as células epiteliais primárias de pregas vocais obtidas de um paciente do sexo masculino, 58 anos, que foi diagnosticado com carcinoma pós-cricóide sem envolvimento das pregas vocais e submetido à laringectomia total. As células foram irradiadas em comprimento de onda de 635 nm (laser vermelho) com fluências de 1, 4, 8, 12, 16 e 20 J/cm<sup>2</sup> (50 mW/cm<sup>2</sup>), que correspondem a tempos de irradiação de 20, 80, 160, 240, 320, e 400 segundos, respectivamente. A irradiação com doses de 8 J/cm<sup>2</sup> resultou em aumento da proliferação celular, com aumento das diferenças com doses subsequentes às 48 e 72 horas após a irradiação. Também mostrou aumento da migração celular e a expressão de alguns genes, como EGF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 e IL-10, envolvidos no processo de cicatrização tecidual. O estudo concluiu que o uso do laser de baixa potência no tratamento proposto foi capaz de estimular a proliferação e migração de células epiteliais das pregas vocais humanas em cultura, bem como aumentar a expressão de alguns genes envolvidos no processo de cicatrização tecidual. Além disso, tratamentos

sucessivos a laser em intervalos de 24 horas têm um efeito benéfico aditivo na cicatrização de tecidos lesionados.

Outro estudo de Lou et al. (2019b) avaliou os prováveis efeitos cicatrizantes do LBP nas pregas vocais por meio de experimentos in vivo e in vitro. No estudo in vivo, fibroblastos de prega vocal foram irradiados sob laser com comprimento de onda de 635nm e densidade de energia 8J/cm<sup>2</sup>. No estudo in vitro com 15 coelhos, a lâmina própria das pregas vocais esquerdas foram retiradas unilateralmente e 6 delas foram tratados com LPB. Os outros três foram utilizados como controle. Após 3 meses todos os animais foram sacrificados para obtenção dos resultados. No estudo observou-se que a irradiação de 8J resultou em aumento na proliferação celular. A diferença entre grupo experimental e controle tornou-se maior após 48 e 72h de irradiação subsequente. O exame histológico mostrou que, em comparação ao grupo de lesão, o ácido hialurônico aumentou, a deposição de colágeno diminuiu e a configuração do colágeno foi mais organizada no tratamento com LBP.

Um estudo de Kagan e Heaton (2017) investigou se o LBP atenuaria os sintomas de fadiga vocal. O estudo foi realizado com 16 adultos vocalmente saudáveis, a triagem feita com o protocolo CAPE-V (*Consensus Auditory-Perceptual Evaluation of Voice*) e teste de sensibilidade à luz, divididos em 4 grupos: vermelho, infravermelho, aquecimento e controle. As irradiações com os diferentes comprimentos de onda do LPB foram realizadas após protocolo de sobrecarga vocal, a saber, leitura em voz alta por 15 minutos, com pausas de 5 minutos, repetidos pelos sujeitos por 3 vezes e um volume de 75dB. Utilizou-se equipamento de LED para irradiação por 20 minutos. A primeira avaliação ocorreu logo após a irradiação e a segunda avaliação foi feita 1 hora após a irradiação. A luz vermelha se mostrou mais eficaz nos marcadores de todos os efeitos pesquisados, não houve resultado significativo imediatamente após a aplicação, as melhores respostas foram obtidas após 1 hora da irradiação.

O laser de baixa potência possui ações indiretas que podem proporcionar efeitos fisiológicos tais como estímulo da microcirculação promover o aumento da vasodilatação e, conseqüentemente o aumento da temperatura. No grupo estudado, suínos, esse aumento de temperatura não foi constante e não foi linear, houve uma variação na temperatura. Os suínos têm uma grande variação da

temperatura e uma grande tendência para a termorregulação, o que pode ter contribuído para os achados desse estudo.

Os lasers de baixa potência tanto o vermelho, como o infravermelho tem efeitos antiedematosos, o que pode ter contribuído para os dados encontrados nesse estudo, com relação à largura da mucosa.

A bioestimulação promovida pelo LBP ainda não tem comprovação científica robusta, contudo, na literatura os achados sugerem a ocorrência de alguns eventos celulares, tais como, proliferação epitelial, endotelial e fibroblástica, elevada síntese colagênica, diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos movimentação celular dos leucócitos, fibroblastos e células epiteliais e aumento da atividade fagocitária dos macrófagos. Além disso, as ações vasculares (angiogênese e vasodilatação), que são importantes no processo de reparo tecidual.

Neste estudo, com a dose e tratamento propostos, foi possível verificar modificações celulares como efeito agudo e tardio do laser de baixa potência. Esses achados mostram que o efeito biológico do laser depende da dosimetria (tempo, energia e potência) e vai ao encontro da Lei de Arndt-Schultz que afirma que se os parâmetros não estiverem dentro da janela terapêutica, não existirão efeitos ou os efeitos serão inibitórios. A janela terapêutica propõe que estímulos fracos aceleram atividade vital e estímulos mais fortes aumentam, até que um pico seja alcançado. Estímulos mais fortes suprimem o efeito, aparecendo uma resposta negativa ou inibitória de algum tratamento, assim sendo, o laser de baixa potência tem Influência sobre as funções celulares, no processo de estimulação, modulação e/ou inibição nos processos biológicos.

Com os resultados deste estudo, comparando grupo controle com grupos experimentais, pode-se afirmar que o efeito do laser na temperatura da laringe depende da variável idade. Nos jovens o efeito do laser é observado mesmo com doses mais baixas (dose única ou múltiplas). Já nos adultos os efeitos são mais observados em múltiplas doses.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados da avaliação do efeito dos LBPs (LV, LIV) isolados ou combinados (LV+LIV) nos suínos permitiram as seguintes conclusões:

**1. Avaliação clínica:** temperatura basal foi 12% maior nos suínos jovens; os LBPs isolados causaram eritema e vermelhidão cutânea transitórios (4 animais);

**2. Termografia:** dose única/LV ↑ temperatura nos suínos jovens, assim como as múltiplas doses dos LBPs; nos adultos/8 doses a temperatura ↑ LIV e LV+LIV. **Largura da mucosa:** efeito agudo/1 dose/LIV ↓ mucosa (LIV < LV+LIV e C), ↓ edema; efeito agudo/8 doses/LBPs ↓ mucosa (LBPs < C), ↓ edema e ↑ matriz extracelular; efeito tardio ↓ mucosa com 1 (LV e LV+LIV < C) e 8 doses (LV+LIV < C);

**3. Tecido conjuntivo:** 1 dose/LBPs/agudo ou tardio não afetou os fibroblastos/fibrócitos, a mitose, as fibras colágenas, elásticas e nervosas; 8 doses/LBPs/agudo não afetaram os fibroblastos/fibrócitos e fibras nervosas (LBPs ≈ C), o LIV ↑ colágenas e elásticas (LIV > LV+LIV), os LBPs combinados ↑ mitose (LV+LIV > LIV e C); efeito tardio/LV+LIV/8 doses ↑ fibroblastos/fibrócitos (LV+LIV > LV, LIV e C), as fibras colágenas (LV+LIV > LV e C) e elásticas (LV+LIV > C) e ↓ mitose (LV+LIV < LV); o LV ↑ fibras nervosas (LV > C);

**4. Músculo estriado da prega vocal:** efeito agudo e tardio/LBPs/1 dose causou hipertrofia (LBPs > C), ↓ total/área das fibras (LBPs < C), não afetou os mionúcleos, integridade/justaposição das fibras, fibras nervosas ou as células mitóticas (LBPs ≈ C); de forma aguda, 8 doses dos LBPs não afetaram o total, a integridade/justaposição (LBPs ≈ C), mas hipertrofiaram as fibras (LBPs > C); isolados ou combinados, os LBPs ↑ mionúcleos (LV > C), fibras nervosas (LV e LV+LIV > C) e mitose (LV+LIV > LIV); efeito tardio/LBPs/8 doses não afetaram o total, integridade/justaposição das fibras e células mitóticas, os lasers isolados ↑ mionúcleos (LV e LIV > C), o LIV e os LBPs combinados ↑ área das fibras (LIV e LV+LIV > C), LV ↑ fibras nervosas (LV > C) e LIV ↑ mionúcleos (LIV > LV e LV+LIV);

O efeito tardio de 1 ou 8 doses dos LBPs foi avaliado em animais adultos, cuja intervenção ocorreu 91 dias antes da morte dos animais, enquanto que o efeito agudo foi considerado em animais adultos, cuja intervenção foi realizada entre 24 horas (dose única) ou 8 dias (8 doses) antes da morte.

O conjunto dos resultados mostrou que a dose única no efeito tardio dos LBPs foi capaz de diminuir a largura da mucosa, possivelmente pelo maior metabolismo inerente aos jovens (temperatura 12% maior que os adultos). Diferentemente, da dose única, as múltiplas doses dos LBPs aumentaram a matriz extracelular, pelo maior número de mioblastos, promoveram a formação de

novos vasos (mucosa e músculo estriado) e a hipertrofia da fibra muscular por proliferação de mioblastos.

O efeito tardio dos LBPs, pontualmente ou ao longo de 8 dias, possivelmente, concorreu com fatores intrínsecos dos animais em crescimento (maior agressividade, vocalização aguda e contínua) e ambientais (clima, alimentação, imunização) que, em conjunto, influenciaram a estrutura dos tecidos laríngeos ao longo dos 90 dias até a morte.

O conjunto dos resultados mostrou que a dose única dos LBPs, de forma aguda, foi capaz de aumentar a produção da matriz extracelular, por estimular a atividade metabólica de fibroblastos/fibrócitos (em repouso) no tecido conjuntivo, por estimular os angioblastos (pericitos) na formação de novos vasos, mas também pela redução do edema, sobretudo com o LIV. No músculo estriado, a dose única hipertrofiou as fibras estriadas, possivelmente por ativar a produção das proteínas das miofibrilas na ausência da proliferação dos mioblastos.

As múltiplas doses dos LBPs nos animais adultos (efeito agudo) foram capazes de reduzir o edema intersticial, possivelmente pela formação de novos vasos na mucosa laríngea. Quanto ao músculo da prega vocal, as múltiplas doses aplicadas nos adultos, causaram a hipertrofia das fibras estriadas por estimular a proliferação dos mioblastos quiescentes, por aumentar a expressão de fibras nervosas e por estimular a neovascularização em torno do músculo tireoaritenóideo.

Diante dos achados considera-se a utilização de dose única ou múltiplas doses, sobretudo, no tratamento das disfonias inflamatórias (nódulos, pólipos, edemas, paresias e paralisias, por refluxo gastroesofágico e/ou laringo-faríngeo, em decorrência de inflamações de vias aéreas), enquanto que múltiplas doses na melhoria funcional em indivíduos com alta demanda vocal.

Sugere-se futuras pesquisas que analisem mediadores químicos, enzimas, espécies reativas de oxigênio e efeito do laser nas glândulas tireoides e paratireoides.

## **7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS**

## 7.1. Limitações do estudo

A realização de estudos experimentais com suínos é algo oneroso, devido aos custos com alimentação, cuidados veterinários e instalações adequadas para os animais. Além disso, a quantidade (n) de suínos utilizados em cada grupo foi pequena e, devido aos métodos histológicos utilizados em nos grupos, alguns materiais foram perdidos. Pela análise estatística foi possível perceber algumas tendências de resultados que, se o número de suínos fosse maior, os resultados poderiam ter sido confirmados, comprovados.

Por ter sido um estudo realizado em um período de 3 meses para a coleta dos dados, a logística foi um grande desafio. O uso de animais em experimentos aborda questões éticas e de bem-estar animal e, faz-se necessário seguir diretrizes rigorosas, o que dificultou a coleta de dados, principalmente porque a pesquisa foi realizada em um período de pandemia no Brasil. Os resultados obtidos em experimentos com suínos não são diretamente aplicáveis a outras espécies, incluindo humanos.

Os resultados obtidos com o laser de baixa potência também podem variar de acordo com alguns aspectos individuais (fototipo de pele, peso, idade entre outros). Portanto, é importante interpretar os resultados com cautela e considerar outras fontes de evidência, não sendo possível generalizar os resultados encontrados nesta pesquisa. O efeito do laser de baixa potência pode depender de vários parâmetros, como a potência, a duração do tratamento e a frequência de aplicação. Nos estudos disponíveis na literatura observa-se grande variação nos parâmetros do laser, o que dificultou a comparação dos resultados desta pesquisa.

Nos estudos experimentais disponíveis, é comum comparar o efeito do laser de baixa potência com um grupo controle que não recebe o tratamento. Contudo, pode ser desafiador estabelecer um grupo controle adequado, pois o efeito do laser de baixa potência é influenciado por fatores externos, características individuais e variáveis não controladas.

No que se refere à fototermografia, a interpretação dos resultados dos estudos experimentais com suínos e pode ser complexa, pois envolve diferentes fatores, tais como a temperatura ambiente, a saúde do suíno e o manejo prévio, que podem afetar os resultados e dificultar a atribuição de causas específicas.

Neste estudo, o equipamento de laser utilizado estava configurado com a antiga programação oferecida pela empresa do laser (DMC), em que as doses de LV e LIV eram oferecidas pelo equipamento sem reduzirem a fluência. Por exemplo, quando a programação de 4J + 4J (LV+LIV) era feita, o aparelho irradiava 4J ao mesmo tempo. Atualmente, essa configuração mudou e não é mais possível irradiar os 4J combinados, deve-se programar as duas luzes em 9 J e a saída será de 4,5J, ou seja, reduzida pela metade. Portanto, neste estudo, o LV e o LIV podem ter interferido nos efeitos de cada luz, quando combinados

Vale ressaltar que o laser de baixa potência tem sido amplamente estudado em várias áreas saúde e da pesquisa e suas limitações podem variar dependendo do contexto específico de cada estudo.

## 7.2. Perspectivas do estudo

Diante do exposto, foi possível propor um direcionador clínico para a área de voz, baseado nos efeitos do LBP na temperatura e nos tecidos da laringe de suínos (Anexo V), no entanto, são necessários estudos clínicos com seres humanos para a proposição de um protocolo visado ao tratamento das disfonias e performance vocal.

**Tabela 19.** Proposta de protocolo para utilizar os LBPs no tratamento de condições clínicas que afetam as pregas vocais.

<b>CONDIÇÕES CLÍNICAS</b>	<b>JOVENS</b>	<b>ADULTOS</b>
<b>Disfonias inflamatórias</b> (nódulos, pólipos, edemas, IVAs, DRGE e RFL)	LIV (dose única / 4J) ou LIV (8 doses / 4J)	LIV (8 doses / 4J)
<b>Sulcos em pregas vocais</b>	LIV (8 doses / 4J)	
<b>Paralisia e paresia em pregas vocais</b>	LV ou LIV (8 doses / 4J)	
<b>Performance e condicionamento vocal</b>	Preferencialmente, LIV (8 doses / 4J) ou LIV (dose única / 4J)	Preferencialmente LIV (8 doses / 4J)

*IVAs: inflamações das vias aéreas; DRGE: doença do refluxo gastro-esofágico com sintomas vocais; RFL: refluxo faringo-laríngeo com sintomas vocais; LV: laser vermelho; LIV: laser infravermelho*

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Alves AN, Fernandes KP, Deana AM, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Effects of low-level laser therapy on skeletal muscle repair: a systematic review. *Am J Phys Med Rehabil.* 2014 Dec;93(12):1073-85. doi: 10.1097/PHM.000000000000158.
2. Alves MFA, Pandorfi H, Montenegro AAdA, Silva RABd, Gomes NF, Santana TC, Almeida GLPd, Marinho GTB, Silva MVd, Silva WAd. Evaluation of Body Surface Temperature in Pigs Using Geostatistics. *AgriEngineering.* 2023; 5(2):1090-1103. <https://doi.org/10.3390/agriengineering5020069>
3. Alves VMN. Furlan RMMM, Motta AR. Efeitos imediatos da fotobiomodulação com laser de baixa intensidade sobre o desempenho muscular: uma revisão integrativa da literatura. *Rev. CEFAC [online].* 2019, v.21, n.4, e12019.
4. Ana PA, Kauffmann CMF, Bachmann L, Soares LES, Martin AA, Gomes ASL, Zezell DM. FT-Raman spectroscopic analysis of Nd: YAG and Er, Cr: YSGG laser irradiated enamel for preventive purposes. *Laser Physics.* v. 24, n. 3, Mar 2014. doi: 10.1088/1054-660X/24/3/035603
5. Andrade FSSD, Clark RMO, Ferreira ML. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. *Rev Col Bras Cir. [periódico na Internet]* 2014; 41(2) *Rev. Col. Bras. Cir.* 2014; 41(2): 129-133. Disponível em URL: [http:// www.scielo.br/rcbc](http://www.scielo.br/rcbc).
6. Andrade G, Villalpando KT. Avaliação clínica do laser de baixa potência no controle da dor, edema e do desconforto após cirurgia plástica periodontal. XX Encontro de Iniciação Científica, V Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. 2015 Set 22-23. Campinas: Puc; 2015.
7. Angiero F, Benedicenti S, Romanos GE, Crippa R. Treatment of hemangioma of the head and neck with diode laser and forced dehydration with induced photocoagulation. *Photomed Laser Surg.* 2008 Apr;26(2):113-8. doi: 10.1089/pho.2007.2143.

8. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg.* 2013 Mar;32(1):41-52.
9. Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS. et al. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: A pilot study. *Lasers Med Sci.* 2006; 21(2):86-9.
10. Beatrice MJ, Neves JG, Pontes Neto P. Diferenciação histopatológica e imunoistoquímica das alterações epiteliais no nódulo vocal em relação aos pólipos e ao edema de laringe. *Rev Bras Otorrinolaringol.* v. 70, n. 4, 439-48, jul./ago. 2004.  
  
Behlau M, Carroll L. Vocal rehabilitation or voice therapy at *Journal of Voice*: a 30-year analysis on publications. *J Voice.* [Internet]. 2022 [citado em 2021 Ago 20]. Disponível em: <https://www.jvoice.org/content/ymvj-voice-rehabilitation-and-voice-therapy>
11. Behlau, M et al. Reduzindo o gap entre a ciência e a clínica: lições da academia e da prática profissional – parte B: técnicas tradicionais de terapia vocal e técnicas modernas de eletroestimulação e fotobiomodulação aplicadas à reabilitação vocal. *CoDAS*, v. 34, n. 5, p. e20210241, 2022.
12. Bertassoli BM Santos AC, Oliveira FD de, Oliveira DM de, Assis-Neto AC, Carvalho AF. Morfologia da laringe e traqueia de gambás (*Didelphis sp.*). *Ciênc anim bras* [Internet]. 2013Apr;14(2):222–9. Available from: <https://doi.org/10.5216/cab.v14i2.17044>
13. Borges RMM, Cardoso DS, Flores BC, Luz RD, Machado CR, Cerveira GP, et al. Effects of different photobiomodulation dosimetries on temporomandibular dysfunction: a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2018;33(9):1859-66. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-018-2533-6>.
14. Broaddus-Lawrence PL, Treole K, McCabe RB, Allen RL, Toppin L. The effects of preventive vocal hygiene education on the vocal hygiene habits and perceptual vocal characteristics of training singers. *J Voice.* 2000; 14(1):58-71.

15. Camargo BTS, Coca KP, Amir LH, Corrêa L, Aranha ACC, Marcacine KO, et al. The effect of a single irradiation of low-level laser on nipple pain in breastfeeding women: a randomized controlled trial. *Lasers Med Sci.* 2020;35(1):63-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-019-02786-5>.
16. Charkoudian N. Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clin Proc.* 2003 May;78(5):603-12. doi: 10.4065/78.5.603.
17. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012 Feb;40(2):516-33. doi: 10.1007/s10439-011-0454-7.
18. COBEA. Brazilian College of Animal Experimentation. Ethical principles in animal experimentation. Accessed on January 21, 2024. Available at: <https://uniube.br/conteudo/207/116>
19. Coca KP, Marcacine KO, Gamba MA et al. Efficacy of LowLevel Laser Therapy in Relieving Nipple Pain in Breastfeeding Women: A Triple-Blind, Randomized, Controlled Trial. *Pain Manag Nurs.* 2016, 17(4): 281-9.
20. CONCEA. Acesso em 21 jan 2024. Disponível em: - [https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros\\_atos/resolucoes/Resolucao\\_Normativa\\_Concea\\_n\\_58\\_de\\_23022023.html](https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_Normativa_Concea_n_58_de_23022023.html)
21. Felismino, A.S., Costa, E.C., Aoki, M.S. et al. Effect of low-level laser therapy (808 nm) on markers of muscle damage: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Lasers Med Sci* 29, 933–938 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1430-2>
22. Fernandes ACN, Ferreira MVN, Serra LSM, Kuckelhaus SAS, Silva EM, Sampaio ALL. Methodological Approaches for Vocal Folds Experiments in Laryngology: A Scoping Review, *Journal of Voice*, 2022, ISSN 0892-1997
23. Ferreira LP, Latorre MRDO, Giannini SPP. et al. Influence of abusive vocal habits, hydration, mastication, and sleep in the occurrence of vocal symptoms in teachers. *J.Voice.* v. 24, n. 1, p 86-92, 2010.

24. Fogaça MC, Carvalho WB, Verreschi ITN. Estimulação tátil-cinestésica: uma integração entre pele e sistema endócrino?. *Rev Bras Saude Matern Infant.* 2006; 6(3):277-83.
25. Frigo L, Fávero GM, Lima HJ, Maria DA, Bjordal JM, Joensen J, Iversen VV, Marcos RL, Parizzoto NA, Lopes-Martins RA. Low-level laser irradiation (InGaAlP-660 nm) increases fibroblast cell proliferation and reduces cell death in a dose-dependent manner. *Photomed Laser Surg.* 2010 Aug;28 Suppl 1:S151-6. doi: 10.1089/pho.2008.2475.
26. Gomes CF, Schapochnik A. O uso terapêutico do LASER de Baixa Intensidade (LBI) em algumas patologias e sua relação com a atuação na Fonoaudiologia. *Distúrbios Da Comunicação*, 29(3), 570–578, 2017. <https://doi.org/10.23925/2176-2724.2017v29i3p570-578>
27. Gómez-Prado J, Pereira AMF, Wang D, Villanueva-García D, Domínguez-Oliva A, Mora-Medina P, Hernández-Avalos I, Martínez-Burnes J, Casas-Alvarado A, Olmos-Hernández A, Ramírez-Necoechea R, Verduzco-Mendoza A, Hernández A, Torres F, Mota-Rojas D. Thermoregulation mechanisms and perspectives for validating thermal windows in pigs with hypothermia and hyperthermia: An overview. *Front Vet Sci.* 2022 Dec 1;9:1023294. doi: 10.3389/fvets.2022.1023294.
28. Gondin J, Guette M, Jubeau M, Ballay Y, Martin A. Central and peripheral contributions to fatigue after electrostimulation training. *Med Sci Sports Exerc.* 2006;38(6):1147-56. <http://dx.doi.org/10.1249/01.mss.0000222843.04510.ca>.
29. Garanhani RM, Cardoso RJ, Capelli GMA, Ribeiro CM. Fisioterapia na paralisia facial periférica: estudo retrospectivo. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007;73(1):112-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992007000100018>.
30. Henriques ACG, Casal C, Castro JFL. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular: revisão da literatura. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 37, n. 4, p. 295–302, jul. 2010.
31. Hiwatashi N, Hirano S, Mizuta M, et al. Biocompatibility and Efficacy of Collagen/Gelatin Sponge Scaffold With Sustained Release of Basic

- Fibroblast Growth Factor on Vocal Fold Fibroblasts in 3-Dimensional Culture. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. 2015;124(2):116-125. doi:10.1177/0003489414546396
32. Hiwatashi N, Hirano S, Mizuta M, Kobayashi T, Kawai Y, Kanemaru SI, et al. The efficacy of a novel collagen-gelatin scaffold with basic fibroblast growth factor for the treatment of vocal fold scar. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11:1598-609.
  33. Hoh JF. Laryngeal muscle fibre types. *Acta Physiol Scand*. 2005 Feb;183(2):133-49. doi: 10.1111/j.1365-201X.2004.01402.x.
  34. Imaizumi M, Nakamura R, Nakaegawa Y, Dirja BT, Tada Y, Tani A. Regenerative potential of basic fibroblast growth factor contained in biodegradable gelatin hydrogel microspheres applied following vocal fold injury: Early effect on tissue repair in a rabbit model. *Braz j otorhinolaryngol [Internet]*. 2021May;87(3):274–82.
  35. Imamura R, Yoshida Y, Fukunaga H, Nakashima T, Hirano M. Thyroarytenoid muscle: functional subunits based on morphology and muscle fiber typing in cats. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001 Feb;110(2):158-67. doi: 10.1177/000348940111000212.
  36. INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Acesso em 13 set 2021. Disponível em <<https://portal.inmet.gov.br/>>.
  37. Kagan LS, Heaton JT. The Effectiveness of Low-Level Light Therapy in Attenuating Vocal Fatigue. *J Voice*. 2017 May;31(3):384.e15-384.e23. doi: 10.1016/j.jvoice.2016.09.004.
  38. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2005; 23(4):355- 61.
  39. Ketz AK, Anders J, Orina J, Garner B, Hull M, Koreerat N, Sorensen J, Turner C, Johnson J. Photobiomodulation Therapy Plus Usual Care Is Better than Usual Care Alone for Plantar Fasciitis: A Randomized Controlled Trial. *Int J Sports Phys Ther*. 2024 Jan 2;19(1):1438-1453. doi: 10.26603/001c.90589.

40. Kishimoto Y, Hirano S, Kitani Y, Suehiro A, Umeda H, Tateya I, et al. Chronic vocal fold scar restoration with hepatocyte growth factor hydrogel. *Laryngoscope*. 2010;120:108-13.
41. Leal-Junior ECP, Lopes-Martins RÁB, Bjordal JM. Clinical and scientific recommendations for the use of photobiomodulation therapy in exercise performance enhancement and post-exercise recovery: current evidence and future directions. *Braz J Phys Ther*. 2019;23(1):71-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjpt.2018.12.002>. PMID:30591412. 26.
42. Leão HZ, Pontes PAL, Coiro JRR, Mariane Lamberts M. Ultra-estrutura do Músculo Vocal Denervado Mecanicamente em Suínos (*Sus Scrofa Domestica*). *Arquivos Internacionais de Fonoaudiologia*, ano 2010, vol. 14 nº 1.
43. Lou(a) Z, Gong T, Kang J, Xue C, Ulmschneider C, Jiang JJ. The effects of photobiomodulation on vocal fold wound healing: in vivo and in vitro studies. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*. 2019;37(9):5.
44. Lou(b) Z, Zhang C, Gong T, Xue C, Scholp A, Jiang JJ. Wound-healing effects of 635-nm low-level laser therapy on primary human vocal fold epithelial cells: an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2019;34(3):547-54.
45. Marchi T, Leal ECP Jr, Bortoli C, Tomazoni SS, Lopes-Martins RAB, Salvador M. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers Med Sci*. 2012;27(1):231-6. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-011-0955-5>. PMID:21739259
46. Marinho RR, Matos RM, Santos JS, Ribeiro MA, Smaniotto S, Barreto EO, Ribeiro RA, Lima RC Jr, Albuquerque RL Jr, Thomazzi SM. Potentiated anti-inflammatory effect of combined 780 nm and 660 nm low level laser therapy on the experimental laryngitis. *J Photochem Photobiol B*. 2013 Apr 5;121:86-93. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.02.012.
47. Marinho, R.R., Matos, R.M., Santos, J.S. et al. Potential anti-inflammatory effect of low-level laser therapy on the experimental reflux laryngitis: a

- preliminary study. *Lasers Med Sci* 29, 239–243 (2014).  
<https://doi.org/10.1007/s10103-013-1323-4>
48. Mello EL, Andrada e Silva MA. O corpo do cantor: alongar, relaxar ou aquecer?. *Rev CEFAC* [Internet]. 2008Oct;10(4):548–56. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1516-18462008000400015>.
  49. Mota-Rojas D, Wang D, Titto CG, Martínez-Burnes J, Villanueva-García D, Lezama K, Domínguez A, Hernández-Avalos I, Mora-Medina P, Verduzco A, Olmos-Hernández A, Casas A, Rodríguez D, José N, Rios J, Pelagalli A. Neonatal infrared thermography images in the hypothermic ruminant model: Anatomical-morphological-physiological aspects and mechanisms for thermoregulation. *Front Vet Sci*. 2022 Aug 4;9:963205. doi: 10.3389/fvets.2022.963205.
  50. Muñoz ISS, Hauck LA, Nicolau RA et al. Efeito do laser vs LED na região do infravermelho próximo sobre a atividade muscular esquelética – estudo clínico. *Rev Bras Eng Bioméd*. 2013; 29(3): 262-8.
  51. Murad MH. Clinical practice guidelines: a primer on development and dissemination. *Mayo Clin Proc*. 2017;92(3):423-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.01.001>.
  52. Nemetz MA, Pontes PA de L, Vieira VP, Yazaki RK. Configuração das pregas vestibulares à fonação em adultos com e sem disfonia. *Rev Bras Otorrinolaringol* [Internet]. 2005Jan;71(1):6–12. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0034-72992005000100002>.
  53. Neves LS, Silva CM de S e, Henriques JFC, Cançado RH, Henriques RP, Janson G. A utilização do laser em Ortodontia. *Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial* [Internet]. 2005Sep;10(5):149–56. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1415-54192005000500015>.
  54. Piva JAAC, Abreu EMC, Silva VS. et al. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. *An. Bras. Dermatol.* (online). 2011, vol. 86, n.5 (cited 2020-01-20), p.947-954. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S036505962011000500013&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S036505962011000500013&lng=en&nrm=iso).

55. Roberto JVB, Souza BB. Utilização da termografia de infravermelho na medicina veterinária e na produção animal Use of infrared thermography in veterinary medicine and animal production. *J Anim Behav Biometeorol* v.2, n.3, p.73-84, 2014.
56. Santos, MGS, SOUSA, CCA. Laser therapy as a therapeutic resource in speech therapy. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 1, p. e8310111463, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i1.11463.
57. Schneider SL, Sataloff RT. Voice therapy for the professional voice. *Otolaryngol Clin North Am.* 2007; 40(5):1133-49.
58. Sivachenko TP, Mechev DS, Abyzov RA. Radionuklidnaia i termograficheskaia diagnostika opukholeĭ gortani [Radionuclide and thermographic diagnosis of laryngeal tumors]. *Med Radiol (Mosk).* 1988 Jan;33(1):27-31.
59. Soares LT, Frigo L. Capítulo II: Histofisiologia Aplicada à Fotobiomodulação. *Fotobiomodulação Aplicada à Fonoaudiologia*. Organizadores Vanessa Mouffron et al. Carapicuíba, SP: Pró-Fono, 2022. INBN impresso 978-6587564-13-5; digital 978-65-57564-14-2.
60. SOLATERM. Sociedade de Termografia na América Latina Acesso em 13 set 2021. Disponível em <<https://termografiaclinica.com.br/>>
61. Steiner, D, Alberton, LR, Belettini, S. Hemiplegia laríngea em equinos. *enciclopedia biosfera*, 2013. 9(17). Recuperado de <https://www.conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/3145>.
62. Tattersall GJ. Infrared thermography: A non-invasive window into thermal physiology. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2016 Dec;202:78-98. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.02.022.
63. Timbie JW, Fox DS, Van Busum K, Schneider EC. Five reasons that many comparative effectiveness studies fail to change patient care and clinical practice. *Health Aff.* 2012;31(10):2168-75.<http://dx.doi.org/10.1377/hlthaff.2012.0150>
64. Vanin AA, Verhagen E, Barboza SD, Costa LOP, Leal-Junior ECP. Photobiomodulation therapy for the improvement of muscular performance

and reduction of muscular fatigue associated with exercise in healthy people: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci.* 2018 Jan;33(1):181-214. doi: 10.1007/s10103-017-2368-6.

65. Zhang Z, Cao Z, Deng F, Yang Z, Ma S, Guan Q, Liu R, He Z. Infrared thermal imaging of patients with acute upper respiratory tract infection: Mixed Methods Analysis. *Interact J Med Res.* 2021 Aug 19;10(3):e22524. doi: 10.2196/22524.
66. Zois CD, Katsanos KH, Tsiano EV. Ear-nose-throat manifestations in Inflammatory Bowel Diseases. Volume 20, No 4 (2007) <http://www.annalsgastro.gr/index.php/annalsgastro/article/view/621/466>



# ANEXO A

## Declaração do comitê de ética



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 07 de agosto de 2020.

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA LARINGE DE SUÍNOS", Protocolo n.º 004/2020, sob responsabilidade do Professor Dr. André Luiz Lopes Sampaio, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Sus scrofa domesticus* (65 machos). A presente declaração é válida pelo período de: 01/01/2021 a 20/02/2024.



Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo  
Coordenador da CEUA – UnB



\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

## ANEXO B

### TERMO DE CONCORDÂNCIA

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**TERMO DE CONCORDÂNCIA DA FAZENDA MIUNÇA**

O senhor **VALDEMIR MARTINS**, gerente da FAZENDA MIUNÇA, está de acordo com a realização, nesta fazenda, da pesquisa **EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA LARINGE DE SUÍNOS** de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **ANA CAROLINA NASCIMENTO FERNANDES**, para realização de sua pesquisa de doutorado, após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (CEUA).

O estudo envolve aplicação de laser de baixa potência (LBP) em três pontos da laringe de suínos. Tem duração de **180 dias**, com previsão de início para **Novembro/2020**.

Brasília, 25 / MAIO / 2020

Gerente responsável pela Fazenda Miunça  
Valdemir M. Martins      CPF 00898946697  
Nome/Assinatura

Chefia responsável pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Otorrinolaringologia (LEPO)  
\_\_\_\_\_  
Nome/Assinatura/

Pesquisador Responsável pelo protocolo de pesquisa:   
Assinatura  
**ANA CAROLINA N. FERNANDES**  
CPF: 739.917.593-49

## ARTIGO 1 (PUBLICADO)

ARTICLE IN PRESS

## Methodological Approaches for Vocal Folds Experiments in Laryngology: A Scoping Review

\*Ana Carolina Nascimento Fernandes,<sup>1,2</sup> Marcus Vinícius Nascimento Ferreira, \*Lucieny Silva Martins Serra,  
<sup>3</sup>Selma Aparecida Souza Kuckelhaus, <sup>4</sup>Eduardo Magalhães da Silva, and <sup>5</sup>André Luiz Lopes Sampaio, \*

†‡§|| Brazil

**Summary: Objective.** The aim of this study was to describe the methodological approaches adopted in experimental researches in laryngology intervention studies.

**Methods.** The study was performed as a scoping review using the electronic databases Medline (PubMed), Web of Science, Embase, BioMed Central and SCOPUS. These databases were manually searched from 1995 (or its inception) until the most recently published articles in June 2022. The inclusion criteria were as follows: a) studies performed with animal models in voice and/or larynx therapy, intervention and/or surgery; b) studies with participant populations composed with animals; c) studies containing original research; d) studies performed with at least one objective measurement for treatment and or intervention; e) studies reporting at least one method of larynx intervention; and f) publications written in English, Spanish or Portuguese. The exclusion criteria were as follows: a) studies considering without any objective intervention and or treatment; b) studies without animal models; and c) studies that reviewed articles or books. These criteria were set to increase inter-study comparability.

**Results.** There were found 26 studies that showed that in experimental laryngology. There were retrieved four main characteristics in the retrieved studies. It was observed five major groups of experimental models used for assessing vocal folds: dog (38.5%), rat/mouse (23.1%), pig (23.1%), rabbit (19.2%), human (11.5%), and sheep (3.8%). In addition, three characteristics were observed: sample (up to 20 subjects 88.5%), type of surgery/intervention (100%) and duration (up to 30 days 61.5%).

**Conclusion.** In experimental laryngology, the state of the art is grounded on mainly in dog, rat and pig in vocal folds assessment. Up to 20 subjects, surgery/intervention and experimental trial lasting no more than 30 days are frequent methodological approaches in this research field

### INTRODUCTION

The use of animals in research is important for enabling the development of new drugs, therapy, surgeries and treatments. It helps scientists understand better the human biology and health and enables testing the effectiveness and safety of new methods making them possible do the clinical applicability.<sup>1</sup>

According to the literature, the rat and mouse are the most frequently used animals. The rabbit, dog and pig follow the list in English language references. In the databases of Latin American literature, the dog exceeds the number of citations of rabbits and swine. Primates are a minority in citations in all databases. Systematic reviews also have the

highest number of citations in the rat, the other species are cited under equal conditions. The vocal folds of rats have three layers, with a morphology and composition of fibrous proteins similar to the laryngeal mucosa and the healing process in the vocal folds of rats, evaluating hyaluronic acid, type I collagen, type III collagen and fibronectin. The relationship between humans and animals of other species has gained, over time, more defined contours, the exploitation of other species has rules and established ethics,<sup>2</sup> the induction of the results of the animal for the human species must have clear and objective criteria to be fulfilled.<sup>3</sup>

In experimental studies related to Laryngology, it is observed that the histology of the vocal folds of the swine, as well as the dimensions of the larynx, are the ones that come closest to that of humans. This affirmation does not mean that this animal is necessarily the best model for phonation studies, in regard to elements such as intrinsic muscles of the larynx, the thickness of the vocal fold, quantity of layers, but the intrinsic musculature of the swine larynx has similarities with that of humans in terms of origins and insertions. Based on histological and stroboscopic aspects, the dog is a model that best approximates the ideal. In addition to that, the swine is an excellent model for studying vocal fold healing, as it presents larynx size and histological structure of the laryngeal mucosa similar to that of humans, that the wound healing process in swine is similar to that of humans, as well as the plan of dissection, so that it is a feasible model for training and improving surgical skills

Accepted for publication July 26, 2022.

Funding: This study has no specific support. Ana Carolina Nascimento Fernandes received a PhD Student scholarship from the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq; proc. 142025/2020-8).

From the <sup>1</sup>Laboratory of Teaching and Research in Otorhinolaryngology, Faculty of Medicine, University of Brasília-UnB - Darcy Ribeiro University Campus; <sup>2</sup>Health, Physical activity and Behavior Research (HEALTHY-BRA) group, Universidade Federal do Tocantins, Tocantins, Brazil; <sup>3</sup>YouthChild Cardiovascular Risk and Environmental (YCARE) Research Group, School of Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>4</sup>Faculty of Medicine, University of Brasília-UnB - Darcy Ribeiro University Campus; and the <sup>5</sup>Speech Language-Pathology Course, University of Brasília, Faculdade de Ciências, Brasília / DF, Brazil.

Address correspondence and reprint requests to Ana Carolina Nascimento Fernandes, Laboratório de Ensino e Pesquisa em Otorrinolaringologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília/DF, Brazil, 70.910-900. E-mail: figa.carolinafernandes@gmail.com

Journal of Voice, Vol. ■■■, No. ■■■, pp. ■■■-■■■

0892-1997

© 2022 The Voice Foundation. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2022.07.025>

## ANEXO D

### ARTIGO 2 (SUBMETIDO)

12/02/24, 08:45 Gmail - Confirming submission to Journal of Voice

---

 Ana Carolina Fernandes <fga\_carolinafernandes@gmail.com>

---

**Confirming submission to Journal of Voice**  
1 mensagem

---

**Journal of Voice** <em@editorialmanager.com> 12 de fevereiro de 2024 às 08:38  
Responder a: Journal of Voice <journal@voicefoundation.org>  
Para: ANA CAROLINA NASCIMENTO FERNANDES <fga.carolinafernandes@gmail.com>

\*This is an automated message.\*

Thermography analysis of low-level laser therapy effect on the swine larynx

Dear Mrs. FERNANDES,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Journal of Voice.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/jvoice/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,  
Journal of Voice

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?  
[https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/28452/supporthub/publishing/](https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/)  
For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>  
Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

At Elsevier, we want to help all our authors to stay safe when publishing. Please be aware of fraudulent messages requesting money in return for the publication of your paper. If you are publishing open access with Elsevier, bear in mind that we will never request payment before the paper has been accepted. We have prepared some guidelines (<https://www.elsevier.com/connect/authors-update/seven-top-tips-on-stopping-apc-scams>) that you may find helpful, including a short video on Identifying fake acceptance letters (<https://www.youtube.com/watch?v=o5I8thD9XIE>). Please remember that you can contact Elsevier's Researcher Support team (<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>) at any time if you have questions about your manuscript, and you can log into Editorial Manager to check the status of your manuscript ([https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/29155/c/10530/supporthub/publishing/kw/status/](https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/29155/c/10530/supporthub/publishing/kw/status/)).

---

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/jvoice/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

---

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=263504b40f&view=pt&search=all&permthid=thread-f:1790692991898302103&siml=msg-f:1790692991898...> 1/1

**Journal of Voice**  
**Thermography analysis of low-level laser therapy effect on the swine larynx**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	JVOICE-D-24-00089
<b>Article Type:</b>	Full length article
<b>Keywords:</b>	therapeutics; Low-Level Light Therapy; swine; Thermography; Larynx; Inflammation
<b>Corresponding Author:</b>	ANA CAROLINA NASCIMENTO FERNANDES, M.D. Universidade de Brasília BRASÍLIA, DF BRAZIL
<b>First Author:</b>	ANA CAROLINA NASCIMENTO FERNANDES, M.D.
<b>Order of Authors:</b>	ANA CAROLINA NASCIMENTO FERNANDES, M.D. Lucieny Martins Serra Eduardo Magalhães da Silva André Luiz Lopes Sampaio Selma Aparecida Souza Kückelhaus
<b>Abstract:</b>	<p><b>Introduction:</b> The vocal folds are intrinsically associated with the thyroarytenoid muscle. During phonation, microlesions and inflammations can occur due to excessive voice use, which can hinder the correct vibration of the mucosa and alter the voice quality. In addition to vocal hygiene and exercises to reduce phonatory effort, resources such as low-level laser therapy (LLLT) are being used in clinical settings. LLLT has been reported to have a biomodulatory action that can reduce pain and edema in the larynx by accelerating the inflammatory process through temperature variation. This study aimed to evaluate the temperature before and after the application of single or multiple doses of red (RL) and infrared (IRL) in the laryngeal tissues of swine. <b>Materials and Method:</b> This descriptive and comparative study was conducted at NuPMIA - FM/UnB and at Granja Miunça, located in the rural region of Brasília. The animals were randomly divided into 13 groups (n = 5) to evaluate the temperature of the larynx before and after LLLT treatment using photothermographic analysis. <b>Results:</b> The study showed the thermoregulatory effect of the laser as an acute response to 1 and 8 doses of LLLT in the swine larynx. 1 dose of RL increased the temperature of the young animals (p = 0.0318); Multiple doses of IRL increased the laryngeal temperature of the adult group by 2.1%, with differences between the applications (paired t-test, p = 0.0208). In the combination of lasers (RL+IRL), the laryngeal temperature in the group of adult animals increased by 0.9%, between the minimum and maximum temperature before application, and between the minimum and maximum temperature after LLLT. There was a difference between the mean temperatures before (p = 0.0010) and after the combined (RL+IRL) (p = 0.0025). Also, the results showed that young animals with no LLLT treatment had 12% higher temperature (35.7 ± 1.7 °C) than adult animals no treatment (31.2±1.9). <b>Interpretation:</b> The results demonstrated that there is an increase and decrease in laryngeal temperature after different low-level laser therapy application protocols and at different doses. These findings could provide a clinical guide for the use of LLLT in humans.</p>

## ANEXO E

### ENSAIO PRÉ-CLÍNICO COM SUÍNOS

Efeito agudo e tardio dos LBPs, in vivo

<b>Objetivo</b>	<b>Suínos</b>	<b>Doses (4 J)</b>	<b>Tratamento</b>
Avaliar o efeito agudo dos LBP na temperatura da laringe	Jovens	1	LV
		8	LBP
	Adultos	8	LIV ou LV + LIV

Efeito agudo e tardio dos LBPs nos tecidos laríngeos

<b>Ensaio</b>	<b>Efeito</b>	<b>Doses (4 J)</b>	<b>Tratamento</b>
Largura da mucosa	agudo	1 8	LV LIV LV+LIV
	tardio	1 8	
Células mitose associadas à mucosa	agudo	1 8	
	tardio	1 8	
Quantificação dos fibroblastos, fibras nervosas (mucosa e músculo da prega vocal)	agudo	1 8	
	tardio	1 8	
Intensidade das fibras de colágeno, elásticas e reticulares	agudo	1 8	
	tardio	1 8	
Quantificação das fibras musculares estriadas, área e mionúcleos	agudo	1 8	
	tardio	1 8	