

# Imunofenotipagem de amígdalas palatinas em crianças com SAOS versus amigdalites de repetição

## Artigo Original

### Autores

**Tiago Chantre**

Serviço de Otorrinolaringologia, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, Portugal

**Juliana Gonçalves**

Human Immunobiology and Pathogenesis Laboratory, iNOVA4Health, Nova Medical School, Portugal

**Sofia A. Cerqueira**

Human Immunobiology and Pathogenesis Laboratory, iNOVA4Health, Nova Medical School, Portugal

**João Nascimento**

Human Immunobiology and Pathogenesis Laboratory, iNOVA4Health, Nova Medical School, Portugal

**Helena Soares**

Human Immunobiology and Pathogenesis Laboratory, iNOVA4Health, Nova Medical School, Portugal

**Inês Alpoim Moreira**

Serviço de Otorrinolaringologia, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, Portugal

**Herédio Sousa**

Serviço de Otorrinolaringologia, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, Portugal

**Correspondência:**

Tiago Chantre  
tiagomendeschantre@gmail.com

Artigo recebido a 13 de Julho de 2023.  
Aceite para publicação a 1 de Agosto de 2023.

### Resumo

**Introdução:** Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) e Amigdalites de Repetição (AR) são as principais indicações para a realização de amigdalectomia em idade pediátrica. Apesar do crescente conhecimento em imunologia tecidual das amígdalas palatinas, a fisiopatologia que leva ao desenvolvimento de SAOS ou AR não é totalmente conhecida.

**Objetivos:** Análise imunofenotípica comparativa de crianças com SAOS *versus* AR. O estudo epidemiológico dos doentes selecionados foi ainda realizado.

**Material e Métodos:** Análise por citometria de fluxo de amígdalas palatinas de crianças com SAOS *versus* AR. No processamento das amígdalas palatinas são isoladas as células mononucleadas (MNCs) e, a partir destas, as células T CD4 e as células T foliculares auxiliares (TFH). Foi também avaliado o tamanho e viabilidade celular e o Inducible T-cell costimulator (ICOS), marcador de ligação das células TFH às células B, durante a produção de anticorpos. Foram incluídos 69 doentes do Hospital Dona Estefânia, com idade inferior a 18 anos, entre novembro de 2018 e novembro de 2022.

**Resultados:** As amígdalas palatinas foram removidas por dissecação extracapsular de 54 crianças com diagnóstico de SAOS e 15 com AR. Nos doentes com SAOS, a média de idades foi de 4.7 ( $\pm$  2.2) anos, sendo 24 do sexo masculino e 30 do sexo feminino. Nos doentes com AR, a média de idades foi de 6.1 ( $\pm$  2.5) anos, sendo 7 do sexo masculino e 8 do sexo feminino. As crianças submetidas a amigdalectomia por SAOS eram significativamente mais novas que as por AR ( $p = 0.035$ ). Não existiram diferenças significativas entre sexos nos dois grupos ( $p = 0.881$ ). Foram encontradas diferenças significativas no grau das amígdalas palatinas, pela Classificação de Brodsky, entre os dois grupos de doentes ( $p = 0.031$ ). As crianças com SAOS eram mais propensas a apresentarem otite média com efusão com necessidade de miringotomia e colocação de tubos de ventilação transtimpânicos no mesmo momento cirúrgico ( $p = 0.034$ ). Não existiram diferenças estatisticamente significativas nas complicações cirúrgicas da amigdalectomia entre os dois grupos de doentes ( $p = 0.456$ ).

Pela análise de citometria de fluxo, a contagem de MNCs e células T CD4 não se encontrou alterada entre os dois grupos. As amígdalas palatinas de doentes com AR apresentaram menos células TFH quando comparadas com amígdalas de doentes com SAOS, mas de forma não significativa ( $p = 0.07$ ). O tamanho das células T CD4 não mostrou diferenças significativas entre grupos ( $p=0.840$ ), porém, a viabilidade destas células foi significativamente superior nos doentes com AR ( $p=0.015$ ). Nos doentes estudados, existiu uma maior intensidade na expressão de ICOS nos doentes com AR face aos doentes com SAOS.

Conclusões: Os nossos resultados apontam para diferenças na resposta linfocitária local entre doentes com SAOS e AR, porém, são ainda necessários estudos adicionais de citometria de fluxo destinados a investigar os mecanismos imunológicos na base destas duas patologias.

Palavras-chave: Síndrome de apneia obstrutiva do sono, amigdalites de repetição, amígdalas palatinas, Imunofenotipagem, pediatria.

## Introdução

A amigdalectomia é uma das cirurgias mais frequentemente realizadas na população pediátrica em todo o mundo<sup>1</sup>. As indicações mais comuns para esta cirurgia são a Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS), seguida de amigdalites de repetição (AR)<sup>1,2</sup>. A hipertrofia das amígdalas palatinas é a causa mais comum de SAOS em idade pediátrica, afetando cerca de 1 a 5% de todas as crianças entre dois e seis anos de idade<sup>3</sup>.

As amígdalas palatinas representam o primeiro local de resposta imunológica a microorganismos inalados e ingeridos, juntamente com o restante tecido linfóide do anel de Waldeyer<sup>4</sup>. Os antígenos luminais são recolhidos por células M especializadas e transportados para o tecido linfóide, caracterizado por um grande número de folículos linfóides, contendo células B diferenciadas e células T foliculares auxiliares (TFH)<sup>5</sup>. Embora os efeitos imunológicos da amigdalectomia tenham sido amplamente debatidos nas últimas décadas, duas revisões sistemáticas recentes concluíram que a amigdalectomia não tem impacto negativo na imunidade humoral e celular das crianças<sup>6,7</sup>. Dado o facto de a SAOS e AR terem formas de apresentação e epidemiologia diferentes,

tem sido sugerido que as alterações imunológicas subjacentes sejam também distintas<sup>8</sup>. Estudos prévios sugeriram um aumento da inflamação nas amígdalas de doentes com SAOS, incluindo o aumento da proliferação de células T<sup>4</sup>, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias<sup>9</sup>, substância P<sup>10</sup> e regulação positiva de receptores para cisteinil-leucotrienos<sup>11</sup>. No entanto, fármacos antiinflamatórios, como corticoesteróides e antagonistas dos receptores de leucotrienos, mostraram apenas efeitos ligeiros nos doentes com SAOS<sup>12</sup>. Essas observações clínicas justificam um estudo mais aprofundado da imunopatologia da hiperplasia das amígdalas palatinas em crianças com SAOS e a sua comparação com doentes com AR. A citometria de fluxo permite a contagem de células totais (MNCs) das amígdalas palatinas e o estudo da imunidade inata e adquirida<sup>13</sup>, podendo ser feita a comparação das diferentes populações celulares de doentes com SAOS face a doentes com AR.

Este estudo teve como objetivo descrever as características clínicas, as intervenções cirúrgicas concomitantes e as complicações pós-operatórias de dois grupos em idade pediátrica submetidos a amigdalectomia por SAOS ou por AR. As amígdalas palatinas dos indivíduos estudados foram submetidas a imunofenotipagem por citometria de fluxo.

## Material e Métodos

### Seleção de Doentes

Entre novembro de 2018 e novembro de 2022, foram incluídos 69 doentes do serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Dona Estefânia (HDE), com idade inferior a 18 anos e submetidos a amigdalectomia. Como critérios de inclusão, foram consideradas apenas doentes em idade pediátrica, com diagnóstico de SAOS ou AR e cujos representantes legais aceitassem a participação nas diferentes etapas do presente estudo, através da leitura e assinatura do consentimento informado. Os critérios de exclusão foram a presença de doenças auto-inflamatórias como o Síndrome PFAPA (*Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis and*

*Adenitis*), doentes amigdalectomizados para diagnóstico de patologias do foro oncológico ou hematológico, doente com diagnóstico simultâneo de SAOS e AR ou ausência de consentimento legal para a recolha de dados e/ou análise das amígdalas palatinas. Todos os doentes amigdalectomizados por AR cumpriram os critérios de Paradise<sup>14</sup>. O diagnóstico de SAOS foi feito a partir da história clínica, exame objetivo e registo de vídeo de sono feito pelos cuidadores, com presença de roncopatia com apneias. A polissonografia (PSG) não rotineiramente realizada em todos os doentes com diagnóstico de SAOS submetidos a amigdalectomia. Os seguintes dados demográficos foram recolhidos: idade, sexo, tamanho das amígdalas palatinas, atraso no desenvolvimento da fala, asma, otite média com efusão (OME) com necessidade de miringotomia e colocação de tubos de ventilação transtimpânicos (TVTT), outras co-morbilidades, ciclos de antibioterapia no ano anterior à cirurgia, indicação para amigdalectomia, outras cirurgias realizadas no mesmo tempo operatório e complicações cirúrgicas. O tamanho das amígdalas palatinas foi definido a partir da classificação de Brodsky<sup>15</sup>, na qual as amígdalas recebem uma pontuação de 1 a 4, a acordo com a percentagem da via aérea ocupada pelas amígdalas (Grau 1 ≤25%; grau 2 de 26 a 50%; grau 3 de 51 a 75% e grau 4 >75).

### **Preparação das amostras de amígdalas palatinas e Análise de Citometria de Fluxo**

As amígdalas, cirurgicamente removidas, foram colocadas em meio RPMI (Gibco, 21875-034) e mantidas a 4 graus Celsius até processamento. Nessa altura, as amígdalas foram cortadas em pedaços de tamanho reduzido com recurso a tesoura e pinça cirúrgicas. Os pedaços foram depois transferidos para uma membrana de 70 µm onde foram esmagados de modo a libertarem as MNCs. Estas células foram diluídas em PBS 1X (VWR chemicals, K813) e transferidas para o topo de uma camada de biocoll (BioWest, L0560-500) num rácio 2:1. As células foram centrifugadas a 1200 x g, 30 minutos, sem travão. Após centrifugação, a camada das MNCs foi recolhida com uma pipeta de Pasteur para

um tubo vazio. Estas células foram lavadas duas vezes com PBS 1X com centrifugação de 700 x g, 10 minutos. Após contagem celular, as células foram ressuspendidas em Mojo buffer 1X e incubadas durante 15 minutos no gelo com nanobeads magnéticas CD4 (1:20) de modo a purificar por seleção positiva as células T CD4. As células foram depois transferidas para um tubo, colocadas dentro de um magneto e incubadas durante 5 minutos. Após esse tempo o líquido foi descartado e as células lavadas duas vezes com *mojo buffer* 1X. As células purificadas T CD4 foram ressuspendidas em *mojo buffer* 1X, contadas e centrifugadas (700 x g, 5 minutos). Metade das células T CD4 foram colocadas em cultura em RPMI suplementado com 10% de FBS (BioWest, S1780-500) e 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco, 15240096) numa concentração de 6x10<sup>6</sup>/mL durante 5 dias. No dia 5 as células foram marcadas com um marcador de viabilidade e com o marcador *Inducible T-cell costimulator* (ICOS), marcador de ligação das células TFH às células B, durante a produção de anticorpos. A outra metade das células foi marcada com CD4, PD-1 e CXCR-5, marcadores que permitem identificar e sortear as células TFH tipicamente encontradas nas amígdalas. Todos os resultados foram adquiridos no citómetro BD FACSCanto II (BD Bioscience) e analisados no *software* FlowJo versão 10.

### **Análise Estatística**

Os dados foram avaliados pelo *software* SPSS versão 25 (*Statistical Package for the Social Sciences*; SPSS Inc., Chicago, IL). Os dados são apresentados sob a forma de média ± desvio padrão. A distribuição da normalidade foi calculada pelo teste D'Agostino & Pearson (n>6) ou pelo teste Shapiro-Wilk (n≤6). Os valores de p value foram calculados pelo teste não normal Mann-Whitney e pelo teste t normal para amostras não emparelhadas. A concordância de médias entre os três grupos de tratamento (amigdalectomia, adenoamigdale-ctomia e adenoamigdalectomia e miringotomia colocação de TVTT) foi avaliada pelo teste de qui-quadrado. Valores de p bicaudais < 0,05 foram considerados significativos.

## Resultados

### Estudo Epidemiológico

As amígdalas palatinas foram removidas por dissecação extracapsular de 54 doentes com diagnóstico de SAOS e 15 com AR. As características demográficas e clínicas estão resumidas na Tabela 1. Nos doentes com SAOS, a média de idades foi de 4.7 ( $\pm$  2.2) anos, sendo 24 (44.4%) do sexo masculino e 30 (55.6%) do sexo feminino. Nos doentes com AR, a média de idades foi de 6.1 ( $\pm$  2.5) anos, sendo 7 (46.7%) do sexo masculino e 8 (53.3%) do sexo feminino. As crianças submetidas a amigdalectomia por SAOS eram significativamente mais novas que as por AR ( $p = 0.035$ ). Não existiram diferenças significativas entre sexos nos dois grupos ( $p = 0.881$ ). Foram encontradas diferenças significativas ( $p = 0.031$ ) no grau das amígdalas palatinas, pela Classificação de Brodsky, entre os dois grupos de doentes (SAOS  $3.0 \pm 0.6$ ; AR  $2.6 \pm 0.6$ ). No grupo de doentes com AR apenas 46.7% dos doentes ( $n = 7$ ) apresentavam amígdalas de grau 3 ou 4, enquanto que no grupo de doentes com SAOS foram 85.2% ( $n = 46$ ). As crianças com SAOS não eram estatisticamente mais propensas a apresentarem história de atraso no desenvolvimento da fala do que as com AR (SAOS 9.3% ( $n = 5$ ) em comparação com AR 0% ( $n = 0$ );

$p = 0.114$ ). Por outro lado, as crianças com SAOS eram mais propensas a apresentarem OME com necessidade de miringotomia e colocação de tubos de ventilação transtimpânicos no mesmo momento cirúrgico (SAOS 48.1% ( $n = 26$ ) em comparação com AR 26.7% ( $n = 5$ );  $p = 0.031$ ). Não existiram diferenças na presença de outras co-morbilidades entre os grupos de estudo ( $p = 0.828$ ). Os doentes com SAOS realizaram  $4.4 \pm 1.8$  ciclos de antibioterapia no ano anterior à cirurgia. Já os doentes com AR realizaram  $6.2 \pm 2.3$  ciclos, não existindo diferenças entre os grupos ( $p = 0.559$ ).

Não existiram diferenças estatisticamente significativas na necessidade de outras cirurgias entre os dois grupos de estudo ( $p = 0.081$ ). Contudo, de referir que 48.1% ( $n = 26$ ) dos doentes com SAOS necessitou de adenoidectomia e miringotomia com colocação de TVTT no mesmo momento cirúrgico, face apenas a 26.7% ( $n = 4$ ) dos doentes com AR. Não existiram diferenças estatisticamente significativas nas complicações cirúrgicas da amigdalectomia entre os dois grupos de doentes ( $p = 0.456$ ). As únicas complicações pós-operatórias reportadas estiveram associadas ao grupo dos doentes com SAOS ( $n = 2$ ; 3.7%) e corresponderam a um episódio de hemorragia pós-amigdalectomia

**Tabela 1**

Estudo epidemiológico dos doentes submetidos a amigdalectomia por Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono e Amigdalites de Repetição.

	SAOS (n = 54)	AR (n = 15)	p value
Idade (anos)	4.7 $\pm$ 2.2	6.1 $\pm$ 2.5	0.035
Sexo (feminino)	30 (55.6%)	8 (53.3%)	0.881
Sexo (masculino)	24 (44.4%)	7 (46.7%)	
Tamanho das amígdalas palatinas (Classificação de Brodsky)	3.0 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.6	0.031
Atraso no Desenvolvimento da Fala	5 (9.3%)	0 (0%)	0.114
Asma	3 (5.6%)	0 (0%)	0.179
OME com necessidade de miringotomia e colocação de TVTT	26 (48.1%)	4 (26.7%)	0.031
Outras co-morbilidades	5 (9.3%)	4 (26.7%)	0.828
Ciclos de antibioterapia no ano anterior à cirurgia	4.4 $\pm$ 1.8	6.2 $\pm$ 2.3	0.559
Amigdalectomia	1 (1.9%)	2 (13.3%)	0.081
Adenoamigdalectomia	27 (50%)	9 (60%)	
Adenoamigdalectomia e miringotomia colocação de TVTT	26 (48.1%)	4 (26.7%)	
Complicações cirúrgicas	2 (3.7%)	0 (0%)	0.456

um dia após a cirurgia, com necessidade de revisão de hemostase no bloco operatório e um caso de hemorragia após adenoidectomia, ao segundo dia, também com necessidade de revisão de hemostase no bloco operatório.

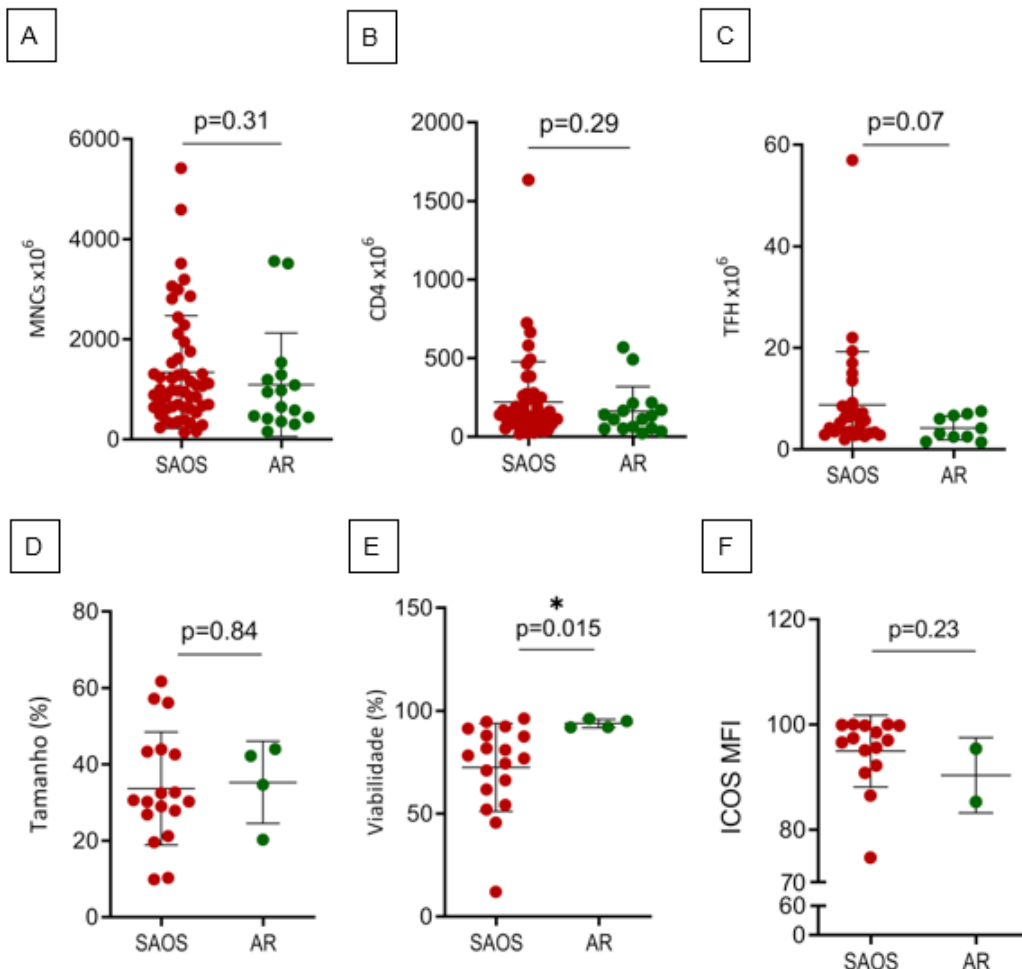
### Análise imunofenotípica

Na figura 1A observamos uma grande dispersão em termos de milhões de MNCs presentes em cada amígdala e concluímos que não existem diferenças significativas no número de células quando comparamos os doentes com SAOS (n = 54) e AR (n = 15),  $p = 0.31$ . Na figura 1B procedeu-se à comparação do número total de células T CD4 purificadas obtidas das amígdalas palatinas extraídas do total de

doentes (SAOS n = 54, AR n = 15), não existindo diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0.29$ ). Na figura 1C comparou-se o número total de células TFH obtidas de amígdalas extraídas de doentes com SAOS (n=30) e de doentes com AR (n=10). Apesar de não ser significativo parece existir uma tendência para amígdalas palatinas de doentes com AR possuírem menos células TFH totais quando comparadas com amígdalas de doentes SAOS ( $p = 0.07$ ). Na figura 1D procedeu-se à comparação do tamanho das células T CD4 dado através dos parâmetros *Forward Scatter-A* (FSC-A) e *Side Scatter* (SSC-A) da citometria de fluxo, obtidas de amígdalas extraídas de doentes com SAOS (n=18) e de doentes com AR (n=4). Não

### Figura 1

Estudo Comparativo dos resultados da análise por citometria de fluxo de amígdalas palatinas de crianças com Síndrome de Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) e Amígdalites de Repetição (AR). A - Células Mononucleadas (MNCs); B - Células T CD4; C - Células T Follicular auxiliares (TFH); D - Tamanho das Células T CD4; E - Viabilidade das Células T CD4; F - Median of fluorescence of inducible T cell co-stimulator (ICOS MFI).





existiram diferenças significativas do tamanho das células T CD4 entre grupos ( $p = 0.84$ ).

As células T CD4 de amígdalas palatinas extraídas de doentes com AR apresentaram maior viabilidade celular do que as provenientes de doentes com SAOS ( $p = 0.015$ ). Esta comparação (Figura 1E) foi feita a partir do marcador de viabilidade na citometria de fluxo, obtidas de amígdalas extraídas de doentes com SAOS ( $n=18$ ) e de doentes com AR ( $n=4$ ). Na Figura 1F comparou-se a média de intensidade de fluorescência (MFI) do marcador ICOS nas células T CD4, obtidas de amígdalas extraídas de doentes com SAOS ( $n=15$ ) e de doentes com AR ( $n=2$ ). Estes dados parecem sugerir uma diferença entre AR e SAOS, ainda que sem validade estatística ( $p=0.23$ ). Neste caso em específico, as amígdalas de doentes com AR parecem apresentar uma intensidade menor de ICOS quando comparadas com amígdalas de doentes com SAOS.

## Discussão

A população incluída neste estudo reflete a mudança nas indicações para amigdalectomia observada internacionalmente, nas últimas décadas<sup>16,17</sup>. Mais crianças foram submetidas a amigdalectomia por SAOS do que aquelas que foram amigdalectomizadas por AR. No grupo de doentes com SAOS observou-se um aumento um pico na realização da cirurgia na idade pré-escolar, o que corresponde à idade em que a prevalência de SAOS é maior<sup>18</sup>. As crianças do grupo com AR eram mais velhas do que aquelas com SAOS e este achado é apoiado por outros estudos internacionais<sup>16,17</sup>. Neste estudo, a única co-morbilidade que se mostrou estatisticamente mais prevalente entre grupos foi a OME com necessidade de miringotomia e realização de TVTT nos doentes com SAOS. Acredita-se que a obstrução da trompa de Eustáquio por hipertrofia adenoideia, leva à existência de uma pressão negativa no ouvido médio e ao aparecimento de OME crónica<sup>19</sup>. Johnston *et al.* descreve que crianças com SAOS são mais propensas a apresentarem um atraso do desenvolvimento

da fala, associando este achado à elevada prevalência de OME<sup>8</sup>. Na nossa população, apesar de todos os doentes com atraso no desenvolvimento da fala se encontrarem no grupo de doente com SAOS e terem OME como co-morbilidade, não existiram diferenças estaticamente significativas entre grupos. As readmissões hospitalares por hemorragia pós-amigdalectomia aumentaram cinco vezes de 1987 a 2013<sup>20</sup>. Outros autores sugerem que à medida que o número de amigdalectomias por SAOS tem aumentando, também aumentou a taxa de hemorragia pós-amigdalectomia<sup>8</sup>. No nosso estudo, as únicas duas hemorragias pós cirúrgicas ocorreram no grupo de doentes com SAOS, mas não existiram diferenças estatisticamente significativas.

A contagem de células totais das amígdalas palatinas, as MNCs, foi particularmente importante na fase inicial do estudo laboratorial, pois permitiu-nos extrapolar a viabilidade da própria amostra. O facto do número de MNCs não apresentar diferenças significativas entre doentes com SAOS e AR indica que o número de células não varia com o motivo da cirurgia. Além disso, o perfil mais inflamatório característico dos doentes com AR não levou a uma alteração do número total de células presentes no órgão. Quando analisamos especificamente para a população de células T CD4, observamos que, à semelhança do que acontece com a contagem das MNCs, também o número de células CD4 não é influenciado pela causa da extração da amígdala. Interessantemente, quando observamos o número de células TFH percebemos que apesar de não ser significativo parece existir uma tendência para amígdalas palatinas de doentes com AR possuírem menos células TFH totais quando comparadas com amígdalas de doentes SAOS. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que um estudo desenvolvido por Crotty *et al.*<sup>21</sup> demonstrou que amígdalas de doentes com AR apresentam uma percentagem menor de células TFH nos centros germinativos quando comparadas com amígdalas provenientes de doentes sem história de AR. Estes dados

levam-nos a colocar a hipótese de que amígdalas de doentes com AR não serão as ideais para estudar reações específicas nos centros germinativos e particularmente a fisiologia das células TFH. Quando o estudo de citometria de fluxo se focou exclusivamente nas células T CD4, concluiu-se que todas as amígdalas provenientes de doentes com AR apresentavam uma viabilidade após 5 dias em cultura muito próxima dos 100%. Já as amígdalas de doentes com SAOS apresentavam uma dispersão maior, que variou entre os 20 e os 98%, sendo a diferença entre grupos estaticamente significativa. Estes dados podem ser de extrema importância para futuros estudos de imunofenotipagem que necessitem de culturas celulares de longa duração. Assim, nesses casos em específico poderá ser aconselhado o uso de amígdalas de doentes com AR em detrimento de amígdalas de doentes com SAOS. O marcador ICOS é um dos principais marcadores das células TFH, o principal subset de células T presente nas amígdalas palatinas<sup>22</sup>. Este marcador desempenha um papel importante, particularmente na produção de anticorpos, já que para que esta se realize é requerida a ligação do ICOS expresso na membrana das células T ao seu ligando (ICOS-L) expresso na superfície das células B<sup>23</sup>. Apesar de apenas ter sido possível avaliar a intensidade do marcador ICOS em amostras de dois doentes com AR e 15 com SAOS, os dados sugerem uma diferença entre os dois grupos em estudo. Na continuação deste estudo, em que iremos aumentar o número de amostras de doentes com AR, estes resultados poderão ser de extrema importância, uma vez que as amígdalas são um dos principais órgãos onde podemos estudar a produção de anticorpos em humanos in vivo. Em ensaios futuros será interessante explorar a variação de outros marcadores requeridos igualmente para a produção de anticorpos como é o caso do CD40L e das citocinas IL-10 e IL-21<sup>24</sup>. Este estudo apresenta algumas limitações, nomeadamente o facto da amostra ser de dimensões reduzidas, com 69 doentes

e apenas 15 com AR. Depois, a população incluída é heterogénea na sua sintomatologia, não existindo a criação de sub-grupos pela gravidade da SAOS ou pelo número efetivo de AR por ano. A PSG não foi rotineiramente realizada nestes doentes, pela baixa disponibilidade do exame. Por outro lado, e como ponto positivo há a referir que os estudos de citometria de fluxo foram realizados por um investigador único, o que permitiu a uniformização do protocolo científico e a minimização dos erros laboratoriais.

## Conclusão

Este estudo é uma das primeiras análises imunofenotípicas comparativas de crianças com SAOS versus AR. As diferentes taxas proliferativas e produção de marcadores celulares em culturas de amígdalas palatinas sugerem que a hipertrofia do tecido linfóide nessas duas patologias estudadas pode ser regulada por mecanismos divergentes. Os nossos resultados levantam novas hipóteses a serem exploradas em estudos adicionais dos mecanismos imunológicos na base das alterações encontradas entre doentes com SAOS e AR.

## Conflito de Interesses

Os autores declaram que não têm qualquer conflito de interesse relativo a este artigo.

## Confidencialidade dos dados

Os autores declaram que seguiram os protocolos do seu trabalho na publicação dos dados de pacientes.

## Proteção de pessoas e animais

Os autores declaram que os procedimentos seguidos estão de acordo com os regulamentos estabelecidos pelos diretores da Comissão para Investigação Clínica e Ética e de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial.

## Política de privacidade, consentimento informado e Autorização do Comité de Ética

Os autores declaram que têm o consentimento

por escrito para o uso de fotografias dos pacientes neste artigo.

### Financiamento

Este trabalho não recebeu qualquer contribuição, financiamento ou bolsa de estudos.

### Disponibilidade dos Dados científicos

Não existem conjuntos de dados disponíveis publicamente relacionados com este trabalho.

### Referências Bibliográficas

1. Johnston J, Kinzett-Carran G, Mahadevan M, Douglas RG. Our experience of the necessity of adenoidectomy or adenotonsillectomy at the time of ventilation tube insertion in 11 941 children with middle ear effusion. *Clin Otolaryngol*. 2018 Aug;43(4):1167-1171. doi: 10.1111/coa.13110.
2. Ramos SD, Mukerji S, Pine HS. Tonsillectomy and adenoidectomy. *Pediatr Clin North Am*. 2013 Aug;60(4):793-807. doi: 10.1016/j.pcl.2013.04.015.
3. Lumeng JC, Chervin RD. Epidemiology of pediatric obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Feb 15;5(2):242-52. doi: 10.1513/pats.200708-135MG.
4. Carrasco A, Sjölander I, Van Acker A, Dernstedt A, Fehrm J, Forsell M. et al. The tonsil lymphocyte landscape in pediatric tonsil hyperplasia and obstructive sleep apnea. *Front Immunol*. 2021 Oct 22;12:674080. doi: 10.3389/fimmu.2021.674080.
5. Nave H, Gebert A, Pabst R. Morphology and immunology of the human palatine tonsil. *Anat Embryol (Berl)*. 2001 Nov;204(5):367-73. doi: 10.1007/s004290100210.
6. Bitar MA, Dowli A, Mourad M. The effect of tonsillectomy on the immune system: a systematic review and meta-analysis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015 Aug;79(8):1184-91. doi: 10.1016/j.ijporl.2015.05.016.
7. Altwairqi RG, Aljuaid SM, Alqahtani AS. Effect of tonsillectomy on humeral and cellular immunity: a systematic review of published studies from 2009 to 2019. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020 Jan;277(1):1-7. doi: 10.1007/s00405-019-05672-6.
8. Johnston J, McLaren H, Mahadevan M, Douglas RG. Clinical characteristics of obstructive sleep apnea versus infectious adenotonsillar hyperplasia in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2019 Jan;116:177-180. doi: 10.1016/j.ijporl.2018.11.004.
9. Kim J, Bhattacharjee R, Dayyat E, Snow AB, Kheirandish-Gozal L, Goldman JL. et al. Increased cellular proliferation and inflammatory cytokines in tonsils derived from children with obstructive sleep apnea. *Pediatr Res*. 2009 Oct;66(4):423-8. doi: 10.1203/PDR.Ob013e3181b453e3.
10. Gozal D, Kim J, Bhattacharjee R, Goldman JL, Kheirandish-Gozal L. Substance P and neurokinin 1 receptors as potential therapeutic targets in children with OSA. *Chest*. 2014 May;145(5):1039-1045. doi: 10.1378/chest.13-2026.
11. Kheirandish-Gozal L, Kim J, Goldbart AD, Gozal D. Novel pharmacological approaches for treatment of obstructive sleep apnea in children. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013

Jan;22(1):71-85. doi: 10.1517/13543784.2013.735230.

12. Kuhle S, Hoffmann DU, Mitra S, Urschitz MS. Anti-inflammatory medications for obstructive sleep apnoea in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Jan 17;1(1):CD007074. doi: 10.1002/14651858.CD007074.pub3.
13. Assadian F, Sandström K, Laurell G, Svensson C, Akusjärvi G, Punga T. Efficient isolation protocol for B and T lymphocytes from human palatine tonsils. *J Vis Exp*. 2015 Nov 16;(105):53374. doi: 10.3791/53374.
14. Paradise JL, Bluestone CD, Colborn DK, Bernard BS, Rockette HE, Kurs-Lasky M. Tonsillectomy and adenotonsillectomy for recurrent throat infection in moderately affected children. *Pediatrics*. 2002 Jul;110(1 Pt 1):7-15. doi: 10.1542/peds.110.1.7.
15. Brodsky L. Modern assessment of tonsils and adenoids. *Pediatr Clin North Am*. 1989 Dec;36(6):1551-69. doi: 10.1016/s0031-3955(16)36806-7.
16. Borgström A, Nerfeldt P, Friberg D, Sunnergren O, Stalfors J. Trends and changes in paediatric tonsil surgery in Sweden 1987-2013: a population-based cohort study. *BMJ Open*. 2017 Jan 13;7(1):e013346. doi: 10.1136/bmjopen-2016-013346.
17. Hallenstål N, Sunnergren O, Ericsson E, Hemlin C, Hessén Söderman AC, Nerfeldt P. et al. Tonsil surgery in Sweden 2013-2015. Indications, surgical methods and patient-reported outcomes from the National Tonsil Surgery Register. *Acta Otolaryngol*. 2017 Oct;137(10):1096-1103. doi: 10.1080/00016489.2017.1327122.
18. Ward SL, Marcus CL. Obstructive sleep apnea in infants and young children. *J Clin Neurophysiol*. 1996 May;13(3):198-207. doi: 10.1097/00004691-199605000-00003.
19. Bluestone CD. Pathogenesis of otitis media: role of eustachian tube. *Pediatr Infect Dis J*. 1996 Apr;15(4):281-91. doi: 10.1097/00006454-199604000-00002.
20. Østvoll E, Sunnergren O, Stalfors J. Increasing readmission rates for hemorrhage after tonsil surgery: a longitudinal (26 Years) national study. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018 Jan;158(1):167-176. doi: 10.1177/0194599817725680.
21. Dan JM, Havenar-Daughton C, Kendric K, Al-Kolla R, Kaushik K, Rosales SL. et al. Recurrent group A Streptococcus tonsillitis is an immunosusceptibility disease involving antibody deficiency and aberrant TFH cells. *Sci Transl Med*. 2019 Feb 6;11(478):eaau3776. doi: 10.1126/scitranslmed.aau3776.
22. Brenna E, Davydov AN, Ladell K, McLaren JE, Bonaiuti P, Metsger M. et al. CD4+ T follicular helper cells in human tonsils and blood are clonally convergent but divergent from non-Tfh CD4+ Cells. *Cell Rep*. 2020 Jan 7;30(1):137-152. e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.016.
23. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*. 2015 Mar;15(3):137-48. doi: 10.1038/nri3804.
24. van Kempen MJ, Rijkers GT, Van Cauwenberge PB. The immune response in adenoids and tonsils. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000 May;122(1):8-19. doi: 10.1159/000024354