

Bruno Peres Paulucci

Análise da expressão dos receptores 1 e 2 de leucotrienos na
população de linfócitos B e T em tonsilas hiperplásicas de crianças:
comparação entre alérgicos e não alérgicos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Renata Cantisani Di Francesco

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Paulucci, Bruno Peres

Análise da expressão dos receptores 1 e 2 de leucotrienos na população de linfócitos B e T em tonsilas hiperplásicas de crianças : comparação entre alérgicos e não alérgicos / Bruno Peres Paulucci. -- São Paulo, 2016.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Otorrinolaringologia.

Orientadora: Renata Cantisani Di Francesco.

Descritores: 1.Tonsila 2.Leucotrieno C4 3.Leucotrieno D4 4.Leucotrieno E4
5.Linfócitos B 6.Linfócitos T 7.Rinite 8.Hipersensibilidade 9.Diferenciação celular
10.Hiperplasia

USP/FM/DBD-178/16

*Aos meus queridos pais Guaraci e Daisy. Incansáveis lutadores, mesmo nos momentos mais áspersos jamais abandonaram os livros. A vocês, que sempre me mostraram as estrelas e ensinaram a segui-las, dedico essa obra.
Ela também é de vocês.*

Ao meu irmão Vinicius, mestre e conselheiro. Ter um irmão é ter para sempre uma infância lembrada com segurança em outro coração.

À Paula, meu amor. Sua presença transforma em esperança o que poderia se converter em desespero. Seu sorriso me inspira, acalenta e fortalece.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Renata Cantisani Di Francesco**, que me guiou desde os primeiros passos, ainda durante a Graduação. Sua dedicação, disponibilidade e paciência sempre foram grandes exemplos para mim.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento**, titular da Otorrinolaringologia, pelo incessante trabalho, fundamental para manter nosso Departamento na vanguarda do ensino e da pesquisa do Brasil.

À **Prof.^a Dra.^a Juliana Pereira**, responsável pelo Laboratório de Imunofenotipagem do HCFMUSP, por ter aberto irrestritamente as portas do laboratório e pelas contribuições feitas durante todo o desenvolvimento do Projeto.

Ao **Prof. Dr. Carlos Caropreso**, coordenador do Grupo de Plástica Facial do HCFMUSP, pela amizade, conselhos, conhecimentos transmitidos e pelo constante incentivo ao aperfeiçoamento profissional.

À **Prof.^a Dr.^a Maria Claudia Nogueira Zerbini**, pelos ensinamentos, sugestões e pela disponibilidade em discutir os métodos e os resultados.

Aos membros da Banca de Qualificação, **Prof. Dr. Rui Imamura**, **Prof.^a Dr.^a Roseli Saraiva M Bittar** e **Prof. Dr. João Ferreira de Mello Jr.** Seus comentários, sugestões e críticas foram fundamentais para a execução desta Tese.

À equipe da Clínica de Imunologia, em especial ao **Sr. Mauricio Gonçalves Freitas**, ao **Sr. Serafim Fidalgo** e ao **Dr. Fabio Fernandes Morato Castro**, que realizaram os testes cutâneos nos pacientes e, acima de tudo, acompanharam com grande entusiasmo este Projeto.

À **Dr.^a Patricia Picciarelli**, médica assistente do Departamento de Patologia do HCFMUSP, pela cooperação incondicional na realização dos exames anatomopatológicos.

À **Dr.^a Debora Levy**, assistente científica do LIM 31, pelo auxílio na execução do RT-qPCR e pela incessante energia e disponibilidade para discutir e revisar a metodologia.

À toda equipe do Laboratório de Imunofenotipagem do HCFMUSP, em especial ao **Bruno Aguiar**, à **Denise Reis**, à **Lis Vilela** e à **Renata Foltran**, por auxiliarem na execução da citometria de fluxo e por ensinarem as técnicas utilizadas.

À **Dr.^a Carla Rosa Teixeira de Godoy**, biomédica do Laboratório de Imunofenotipagem do HCFMUSP e da empresa BD, pelo fundamental auxílio realizado no início deste Projeto. Sem ele, o caminho seria muito mais penoso.

À **Sr.^a Solange Rossi**, circulante de sala da Otorrinolaringologia, pelo grande trabalho que sempre desenvolveu em nossa Clínica, especialmente neste Projeto, verificando a coleta e o armazenamento dos tecidos.

A todos os funcionários, em especial às secretárias da Otorrinolaringologia, **Sr.^a Maria Marileide Alves, Sr.^a Maria Marcia Alves, Sr.^a Katia Tereza K Cota e Sr.^a Lucivania Lima da Silva**, por toda atenção e ajuda dispensadas durante a Graduação, Residência e Pós- Graduação.

Ao **Sr. Niltron Cabrera**, farmacêutico da empresa DBR Biotech, pela paciência para ensinar a adequada metodologia de utilização dos anticorpos.

A todos os amigos do Departamento de Otorrinolaringologia, em especial ao **Ali Mahmoud** e ao **Ronaldo Frizzarini**, em quem sempre pude confiar em momentos de angústias e incertezas e com quem tenho o privilégio de conviver pessoal e profissionalmente.

A todos os **assistentes, residentes e fellows do Departamento de Otorrinolaringologia**, bem como aos **assistentes da Clínica de Anestesiologia**, que trabalham incansavelmente e que de uma forma ou de outra contribuíram para a execução desta Tese.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela contribuição financeira por meio de Bolsa de Estudos.

A todos os pacientes e seus responsáveis que, independentemente de qualquer retorno, aceitaram com alegria e entusiasmo participar desta pesquisa. A vocês sempre serão direcionados nossos esforços.

“Quero conhecer os pensamentos de Deus... O resto é detalhe.”

Albert Einstein

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Siglas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
Lista de Símbolos	xv
Lista de Quadros	xvi
Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xviii
Resumo	xix
<i>Abstract</i>	xx
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 Bases de dados	7
3.2 A hiperplasia tonsilar	7
3.3 A hiperplasia tonsilar e a inflamação sistêmica	9
3.4 Relação entre a hiperplasia tonsilar e as alergias respiratórias	10
3.5 Os receptores de cisteinil-leucotrienos	11
3.5.1 O CysLTR1	11
3.5.2 O CysLTR2	12
3.6 Os CysLTRs e a maturação celular	12
3.7 Os CysLTRs e a proliferação celular	13
3.7.1 Neoplasias	13
3.7.2 Proliferação não-neoplásica	15
3.8 As tonsilas e os leucotrienos	16
3.9 A Fisiopatologia dos DRS pediátricos	17
3.10 Diagnóstico de SAOS na infância	18
3.10.1 O <i>Pediatric Sleep Questionnaire</i>	18
3.11 O Tratamento dos DRSs pediátricos	19
4 PACIENTES E MÉTODOS	20
4.1 Parecer ético	21
4.2 Desenho do estudo	21
4.3 Pacientes	21
4.3.1 Definição dos grupos de estudo	22
4.3.2 Critérios de inclusão	22
4.3.3 Critérios de exclusão	23
4.4 Avaliação clínica	23

4.4.1 Definição do quadro clínico	23
4.4.2 Exame físico	24
4.5 O teste cutâneo para alérgenos inalatórios	24
4.6 Coleta das amostras teciduais	26
4.7 Fixação e avaliação anatomopatológica	26
4.8 Citometria de fluxo	28
4.8.1 Identificação das amostrasteciduais	28
4.8.2 Preparo dos tecidos tonsilares	28
4.8.3 A viabilidade celular	29
4.8.4 Separação dos linfócitos de sangue periféricos	30
4.8.5 Marcação dos tubos	30
4.8.6 Adição dos anticorpos	31
4.8.7 Leitura e análise das amostras em citômetro de fluxo	32
4.9 RT-qPCR	35
4.9.1 Extração do RNA total	35
4.9.2 Síntese de cDNA	36
4.9.3 Amplificação	36
4.10 Análises de dados	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Descrição da amostra	40
5.2 Correlações clínicas	41
5.3 Citometria de fluxo	42
5.3.1 Comparações das expressões de CysLTR1 e CysLTR2 em SE e NS	42
5.3.1.1 Células de TF	42
5.3.1.2 Células de TP	42
5.3.1.3 Sangue periférico	43
5.3.2 Expressão de CysLTR1 versus CysLTR2	45
5.3.3- Expressão de CysLTRs nos diferentes estágios de diferenciação celular	46
5.4 RT-qPCR	49
5.5 Testes de correlação	50
5.5.1 Correlações clínico-celulares	50
5.5.2- Correlações entre a expressão celular e a expressão genética	51
6 DISCUSSÃO	53
6.1 O perfil populacional	54
6.2 O Diagnóstico de SAOS	56
6.3 Os CysLTRs e a hiperplasia de TF	57
6.4 Os CysLTRs e a maturação linfocitária	61

7 CONCLUSÕES	65
8 ANEXOS	67
Anexo A: Carta de aprovação da Cappesq- projeto original	68
Anexo B: Carta de aprovação da Cappesq- emenda	69
Anexo C: Aprovações na Plataforma Brasil- Projeto original e emenda	70
Anexo D: Protocolo de extração de RNA total de células em suspensão ...	70
Anexo E: Protocolo do para transcrição de RNA em cDNA	71
Anexo F: Protocolo para amplificação de cDNA	71
Anexo G: Curva padrão dos Ct para detecção de CysLTR1	72
Anexo H: Curva padrão dos Ct para detecção de CysLTR2	72
Anexo I: Curva padrão dos Ct para detecção de β -actina	73
9 REFERÊNCIAS	74

LISTA DE SIGLAS

CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Lilacs	Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
SciELO	<i>Scientific Eletronic Library Online</i>
Sibi USP	Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO	5-Lipoxigenase
A2	Adenotonsilectomia
AR	Alergias respiratórias
CD	<i>Cluster</i> (grupo) de diferenciação
cDNA	DNA complementar
Ct	<i>Cycle Threshold</i> (ciclo limiar)
CysLT	Cisteinil-leucotrieno
CysLTR	Receptor de cisteinil-leucotrieno
CysLTR1	Receptor tipo 1 de cisteinil-leucotrienos
CysLTR2	Receptor tipo 2 de cisteinil-leucotrienos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DC	Células dendríticas
DP	Desvio padrão
DRS	Distúrbios respiratórios do sono
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Detector de fluorescência
FSC	Dispersão anterior de luz
GC	Células grandes
HT	Hiperplasia tonsilar
IAH	Índice de apneias e hipopneias
ID	Identificação
IgG1	Imunoglobulina G classe 1
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
LT1	Tubo de células marcadas para CysLT1R, CD3 e CD19
LT2	Tubo de células marcadas para CysLT2R, CD3 e CD19
LTA4H	Leucotrieno-A4 hidrolase
LTC4	Leucotrieno C4
LTC4S	Leucotrieno-C4 sintase
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
NaCl	Cloreto de sódio
NGF	Fator de crescimento nervoso

NS	Indivíduos não sensibilizados
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-Azida 0,1%	Tampão fosfato-salino com azida de sódio 1%
PBS-BSA	Tampão fosfato-salino com albumina sérica bovina 1%
PC	Pequenas células
PCR	Proteína C reativa
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridina-clorofila
PGE2	Prostaglandina E2
PSG	Polissonografia noturna
PSQ	<i>Pediatric Sleep Questionnaire</i> (Questionário Pediátrico do Sono)
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR	Reação de polimerização em cadeia quantitativa em tempo real
SAOS	Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono
SE	Indivíduos sensibilizados
SP	Amostra de sangue periférico
SSC	Dispersão lateral de luz
TC	Total de células
TCAI	Teste cutâneo para alérgenos inalatórios
TF	Tonsilas Faríngeas
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral tipo alfa
TP	Tonsilas Palatinas
Trk-A	Tropomiosina receptor cinase A
vs	<i>Versus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

h	Hora
ml	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
ng	Nanograma
PNU	Unidade de Nitrogênio Proteico
ρ	Rho
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
UBE	Unidade Biológica
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
®	Marca registrada
=	Igual
+	Mais
-	Menos
\pm	Mais ou menos
<	Menor
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
%	Porcento

LISTA DE QUADROS

Quadro1 -Os extratos de alérgenos utilizados no TCAI	25
Quadro2 -Fórmula para cálculo do diâmetro da pápula cutânea no TCAI	26
Quadro 3 - <i>Primers</i> utilizados na amplificação de CysLTR1, CysLTR2, e β -actina.	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática dos compartimentos e composição celular das tonsilas palatinas	8
Figura 2 - Hiperplasia Folicular Linfóide em Tonsila	9
Figura 3- Enzimas envolvidas na síntese dos leucotrienos	13
Figura 4 - Análise da população celular de TF em citometria de fluxo. Os conjuntos de células pequenas, grandes e totais foram avaliados separadamente	33
Figura 5 - Análise das populações de leucócitos em sangue periférico por citometria de fluxo. Os LP estão localizados na área vermelha	34
Figura 6- Proporções de células T e B CysLTR+	35
Figura 7 - Resumo da metodologia utilizada no presente estudo	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas da população em estudo.....	40
Tabela 2 - Correlações entre os dados clínicos dos pacientes do grupo SE	41
Tabela 3 - Correlações entre os dados clínicos dos pacientes do grupo NS	41
Tabela 4 - Diferenças entre a expressão de CysLTR1 e de CysLTR2 em linfócitos de tonsilas faríngeas dos indivíduos SE e NS	43
Tabela 5 - Diferenças entre a expressão de CysLTR1 e de CysLTR2 em linfócitos de tonsilas palatinas dos Indivíduos SE e NS	44
Tabela 6 - Diferenças entre a expressão de CysLTR1 e de CysLTR2 em linfócitos de sangue periférico dos indivíduos SE e NS	45
Tabela 7 - Expressão de CysLTR1 versus CysLTR2 em indivíduos SE	45
Tabela 8 - Expressão de CysLTR1 versus CysLTR2 em indivíduos NS	46
Tabela 9 - Análise multivariada da expressão dos CysLTRs em SP, PC e GC em SE.....	48
Tabela 10 - Análise multivariada da expressão dos CysLTRs em SP, PC e GC em NS.....	49
Tabela 11 – Expressão gênica relativa de CysLTR1eCysLTR2 em relação a β -actina	49
Tabela 12 - Correlações entre os achados clínicos e a expressão dos CysLTRs nas subpopulações celulares de indivíduos SE.	50
Tabela 13 - Correlações entre os achados clínicos e a expressão dos CysLTRs nas subpopulações celulares de indivíduos NS.	51
Tabela 14 - Correlações entre a expressão dos CysLTRs em cada subpopulação celular com as expressões gênicas em indivíduos SE.....	52

RESUMO

Paulucci BP. *Análise da expressão dos receptores 1 e 2 de leucotrienos na população de linfócitos B e T em tonsilas hiperplásicas de crianças: comparação entre alérgicos e não alérgicos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: Os receptores CysLT1R e CysLT2R estão classicamente envolvidos em processos alérgicos, porém recentes estudos mostraram seu papel na proliferação celular linfocitária em tonsilas hiperplásicas, bem como na maturação de linfócitos na medula óssea. Clinicamente, somente o CysLTR1 pode ser bloqueado por montelucaste e há poucos dados disponíveis sobre a função CysLTRs na maturação de linfócitos em tonsilas. O objetivo primário foi comparar a expressão de CysLTR1 e CysLTR2 nas células B e T das tonsilas hiperplásicas de crianças alérgeno-sensibilizadas (SE) com crianças controles (NS). O objetivo secundário foi comparar a expressão CysLTRs em linfócitos de sangue periférico com a expressão em linfócitos de tonsilas hiperplásicas em diferentes fases amadurecimento, além de verificar a influência das alergias respiratórias neste processo. **MÉTODOS:** Sessenta crianças com idade entre 5 e 10 anos, referenciadas para adenoamigdalectomia no HCFMUSP, foram divididas em grupos SE (30 indivíduos com resposta positiva ao teste cutâneo para alérgenos inalatórios) e NS (30 indivíduos com ausência de respostas positivas no teste). As células das tonsilas removidas e os leucócitos de sangue periférico (SP) foram corados para CysLTR1, CysLTR2, CD19 (células B) e CD3 (células T) e contados através de citometria de fluxo. Os linfócitos das tonsilas foram divididos em células pequenas em diferenciação (PC) e grandes células mitóticas (GC); a expressão de mRNA dos genes CysLTR1 e CysLTR2 foi medida utilizando RT-qPCR. Os indivíduos foram comparados quanto às médias de cada subpopulação celular em SE versus em NS, utilizando-se o teste t de student. Já para a comparação entre as médias de SP versus PC versus GC foi utilizada a ANOVA e o teste de Tukey. **RESULTADOS:** Na comparação SE versus NS, entre as PC, o grupo SE mostrou expressão reduzida de CD3 +/ CysLTR1 + ($4,6 \pm 2,2$ vs $6,5 \pm 5,0$; $p = 0,04$). Em relação aos linfócitos grandes, o grupo SE mostrou menor expressão de CD3+/CysLTR1 ($40,9 \pm 14,5$ vs $47,6 \pm 11,7$; $p = 0,05$), CD19 +/CysLTR1 + ($44,6 \pm 16,9$ vs $54,1 \pm 12,4$; $p = 0,01$), e CD19 +/CysLTR2+ ($55,3 \pm 11,3$ vs $61,5 \pm 12,6$; $p = 0,05$). Considerando o número total de linfócitos, o grupo SE tinha menos linfócitos CD3 +/CysLTR1+ ($11,1 \pm 5,5$ vs. $13,7 \pm 6,2$, $p = 0,04$). Todas as outras populações de células exibiram uma expressão reduzida no grupo SE sem significância estatística. A expressão de CysLT2R foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que CysLT1R na maioria das populações de células estudadas. A expressão de RNAm não mostrou diferenças significativas entre os grupos. Já em relação à comparação da expressão nas células em diferentes fases de maturação celular, entre as células CD3+ houve grande expressão de CysLTR1 e 2 GC e tal expressão diminuiu progressivamente em PC e SP. Em células CD19+, a expressão mais alta de CysLTR1 e 2 foi encontrada no SP, enquanto PC apresentou a menor e as GC mostraram expressão intermediária. Esse padrão manteve inalterado quando os indivíduos foram categorizados em SE e NS. **CONCLUSÕES:** A expressão de CysLTRs é mais elevada nos linfócitos de crianças NS, e CysLTR2 tem maior expressão do que CysLTR1. As alergias respiratórias não parecem ser um estímulo para a ocorrência de hiperplasia tonsilares e os CysLTRs parecem estar envolvidos na maturação de linfócitos que ocorre em tonsilas, sem aparente influência das alergias respiratórias.

Descritores: tonsila, leucotrieno C4, leucotrieno D4, leucotrieno E4, linfócitos B, linfócitos T, rinite, alergia, diferenciação celular, hiperplasia

ABSTRACT

Paulucci BP. *Analysis of the expression of receptors 1 and 2 of leukotrienes in the population of B and T lymphocytes in hyperplastic tonsils of children: a comparison of allergic and nonallergic* [thesis]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

BACKGROUND: CysLT1R and CysLT2R receptors are classically involved in allergic processes and recent studies have demonstrated their role in the proliferation of lymphocytes in hyperplastic tonsils and in the maturation of lymphocytes in the bone marrow. Clinically, only CysLTR1 can be blocked by montelukast and there are few data available on the CysLTRs role in the maturation of lymphocytes in tonsil. The primary objective was to compare the expression of CysLTR1 and CysLTR2 in B and T cells of hyperplastic tonsil of allergen sensitized children (SE) with control children (NS). The secondary objectives were: to compare the CysLTRs expression in peripheral blood lymphocytes with expression in lymphocytes of hyperplastic tonsils at different stages of maturation; to verify the influence of respiratory allergies in this process. **METHODS:** Sixty children aged 5 to 10 years, referred for adenotonsillectomy at HCFMUSP, were divided into SE groups (30 subjects with positive response to skin prick test to inhalant allergens) and NS (30 subjects with no positive responses in test). The removed cells of the tonsils and peripheral blood leukocytes (SP) were stained for CysLTR1, CysLTR2, CD19 (B cells) and CD3 (T cells) and counted by flow cytometry. Tonsil Lymphocytes were divided into small cell differentiation (PC) and large mitotic cells (GC); mRNA expression of genes CysLTR1 and CysLTR2 was measured using RT-qPCR. Individuals were compared regarding the average of each cell subpopulation in SE versus NS, using the Student's t test. For the comparison between the averages of SP versus PC versus GC we used ANOVA and Tukey test. **RESULTS:** Comparing SE versus NS, between the PC, the SE group showed reduced expression of CD3+/CysLTR1+ (4.6 ± 2.2 vs 6.5 ± 5.0 ; $p=0.04$). For large lymphocytes, the SE group showed lower expression of CD3+/CysLTR1+ (40.9 ± 14.5 vs 47.6 ± 11.7 , $p=0.05$), CD19+/CysLTR1+ ($44.6 \pm 16.9 \pm 12.4$ vs. 54.1 ; $p = 0.01$) and CD19+/CysLTR2+ (55.3 ± 11.3 vs. 61.5 ± 12.6 , $p=0.05$). In the set of total number of lymphocytes, the group SE had less CD3+/CysLTR1+ lymphocytes (11.1 ± 5.5 vs. 13.7 ± 6.2 , $p = 0.04$). All other cell populations showed reduced expression in SE group without statistical significance. The CysLT2R expression was significantly higher ($p < 0.05$) than CysLT1R in most cells studied populations. mRNA expression did not differ between groups. Regarding the comparison of expression in cells in different stages of maturation, among CD3+ cells, there was extensive expression CysLTR1 and 2 in GC and such expression progressively decreased in PC and SP. In CD19+ cells, the highest expression of CysLTR1 and 2 was found in SP while PC had the lowest and GC showed intermediate expression. This pattern remained unchanged when patients were categorized in SE and NS. **CONCLUSIONS:** CysLTRs expression is higher in lymphocytes of NS children, and CysLTR2 has higher expression than CysLTR1. Respiratory allergies do not seem to be a stimulus to the occurrence of tonsillar hyperplasia and CysLTRs appear to be involved in the maturation of lymphocytes that occurs in tonsil without apparent influence of respiratory allergies.

Descriptors: tonsil, leukotriene C4, leukotriene D4, leukotriene E4, B-lymphocytes, T-lymphocytes, rhinitis, allergy, cell differentiation, hyperplasia

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As tonsilas palatinas (TP) e a tonsila faríngea (TF) são órgãos imunológicos secundários que iniciam o seu desenvolvimento no primeiro ano e alcançam o maior tamanho entre o quarto e o oitavo anos de vida (Noussios, 2003). A hiperplasia tonsilar (HT) acomete 3 a 5% da população entre 2 e 10 anos de idade, sendo um fator chave na fisiopatologia da Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) e dos demais distúrbios respiratórios do sono (DRS) nessa faixa etária (Carter et al., 2014).

A histologia das tonsilas hiperplásicas caracteriza-se por padrão folicular (Dell'Aringa et al., 2005) com alta atividade mitótica de centroblastos, superpopulação de centrócitos, expansão dos centros germinativos e aumento das áreas subcapsulares (Rademakers et al., 1992). Sistemicamente, as crianças portadoras de SAOS secundária a HT apresentam *status* inflamatório exacerbado (Kaditiset al., 2009), mantido por elevados níveis séricos de citocinas, como interleucinas, TNF-alfa e cisteinil-leucotrienos (CysLTs).

Os CysLTs foram descritos inicialmente como mediadores de respostas Th2 (Nathan, 2008) e atuam sobre os receptores (CysLTR) 1 e 2 (Capra et al., 2007). Estudos recentes demonstraram que esses receptores exercem também um papel na maturação (Denzlinger et al., 2001) e ativação (Lamoureux et al., 2006) de linfócitos e células dendríticas. Espinosa et al. (2003) e Matsuyama et al. (2007) demonstraram que esses receptores são agonistas da divisão celular em distúrbios inflamatórios e neoplasias. Em tonsilas hiperplásicas de crianças,

o estudo de Tsaoussoglou et al. (2012) sugere um papel para os CysLTRs na proliferação linfocitária. Os dados sobre a ação dos CysLTRs na maturação dessas células nos centros germinativos tonsilares são escassos.

Georgalas et al. (2005) observaram resposta positiva aos medicamentos antileucotrienos em crianças com SAOS de grau leve a moderado, mesmo na ausência de alergias respiratórias. Nos estudos de Goldbart et al. (2005; 2012), houve evidente diminuição volumétrica das tonsilas quando os pacientes realizaram terapia com montelucaste.

Em relação ao papel das alergias respiratórias (AR) na fisiopatologia da HT, diferentes autores publicaram resultados divergentes. Os estudos populacionais de Eren et al. (2015) e Ameli et al. (2014) mostram correlação inversa entre HT e AR. Já os estudos de Huang et al. (2001) e Evcimik et al. (2015) descrevem as doenças alérgicas (rinite, asma e urticária) como fatores de risco ao desenvolvimento da HT. Os trabalhos de Filiaci et al. (1997) e McColley et al. (1997) mostraram que a exposição a alérgenos específicos foi relacionada ao aumento da TF.

Considerando as evidências de que os CysLTRs são agonistas da divisão celular linfocitária em tonsilas e que não há consenso sobre o papel da AR nesse processo, a hipótese primária era que as crianças portadoras de AR teriam maior expressão dos receptores do que os indivíduos normais. Em relação à ação dos CysLTRs na maturação celular, considerando que as células tonsilares apresentam alta atividade mitótica, a hipótese secundária era que a expressão de CysLTRs nessas células seria maior do que em linfócitos de sangue periférico.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo primário do presente estudo foi comparar quantitativamente, entre crianças sensibilizadas e não sensibilizadas aos alérgenos respiratórios, a expressão dos CysLTR1 e CysLTR2 na superfície de linfócitos B e T de TF e TP hiperplásicas causadoras de SAOS.

O objetivo secundário foi comparar quantitativamente a expressão dos CysLTR1 e CysLTR2 na superfície de linfócitos B e T de tonsilas faríngeas em diferentes fases de maturação com a expressão desses receptores na superfície de linfócitos B e T de sangue periférico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Bases de dados

A presente revisão de literatura foi feita através de pesquisas nas seguintes bases de dados:

Língua Portuguesa: Bireme/Biblioteca Virtual em Saúde, SciELO e Sibi USP.

Língua Espanhola: Lilacs.

Língua Inglesa: Pubmed, Embase/ Elsevier, Cochrane Library, Medline.

3.2 A hiperplasia tonsilar

Anatomicamente, as tonsilas apresentam quatro compartimentos principais (Kuper et al., 1992; Hoefakker et al., 1993) - Figura 1.

1) Criptas reticulares: o epitélio escamoso estratificado invaginado da superfície do órgão está em contato com a via aérea. (Krameret al., 2001).

2) Região extrafolicular: as células precursoras de linfócitos T deixam a medula óssea e migram para os órgãos linfoides secundários para se diferenciar. Em tonsilas, estão concentrados nessa região (Kaditiset al., 2008;

Kaditis et al., 2009) e iniciam sua expansão clonal após o contato com o antígeno específico.

3) Folículos Primários: Formados por linfócitos B em repouso, recirculantes e de memória. Têm baixa atividade proliferativa.

4) Folículos Secundários: desenvolvem-se após contato antigênico e indução da proliferação monoclonal de linfócitos B. Centralmente apresentam o centro germinativo, dividido em zona escura, com alta atividade proliferativa de células aumentadas de tamanho (centroblastos) e a zona clara, com células menores em maturação (centrócitos) (Tsaoussoglou et al., 2014; Mashid et al., 2009). A zona do manto encontra-se periféricamente aos centros germinativos e apresenta predominantemente linfócitos B de memória (Musiatowicz et al., 2001).

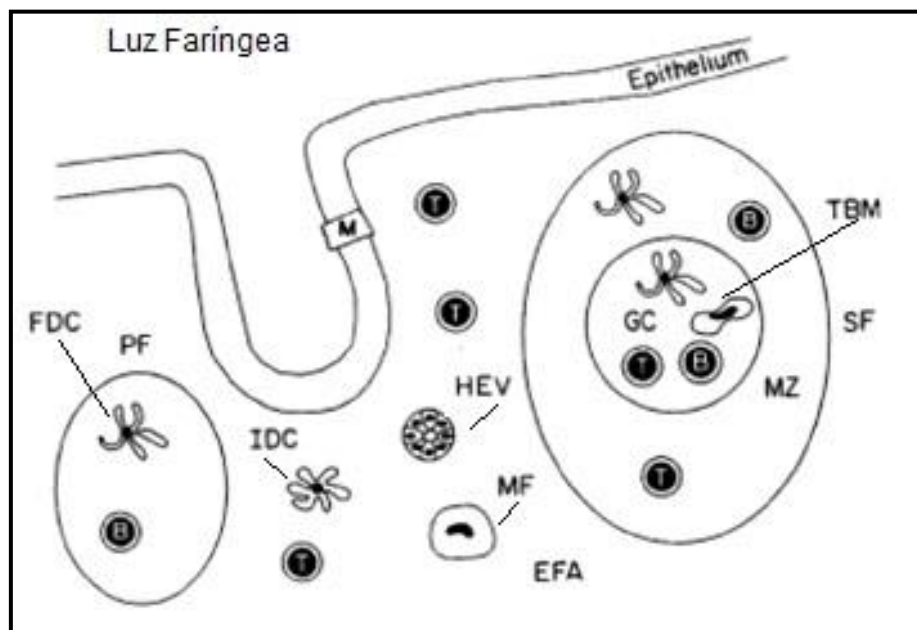


Figura 1: Representação esquemática dos compartimentos e composição celular das tonsilas palatinas
 B: Linfócitos B; T: Linfócitos T; FDC: Célula Folicular Dendrítica;
 IDC: Célula Dendrítica Interfolicular; MF: Macrófago; HEV: Veia Folicular;
 M: Célula de mucosa; PF: Folículo Primário; SF: Folículo Secundário;
 MZ: Zona do Manto; GC: Centro Germinativo; EFA: Área Extrafolicular;
 Adaptado de Hoefakker et al. (1993)

A hiperplasia tecidual tonsilar segue o padrão folicular linfóide (Dell'Aringa et al., 2005; Rademakers et al., 1992; Mowry et al., 2008). Caracteriza-se por aumento geral do órgão, com hiperplasia celular; arquitetura tecidual preservada e folículos secundários com tamanhos aumentados e formatos variáveis (Figura 2).

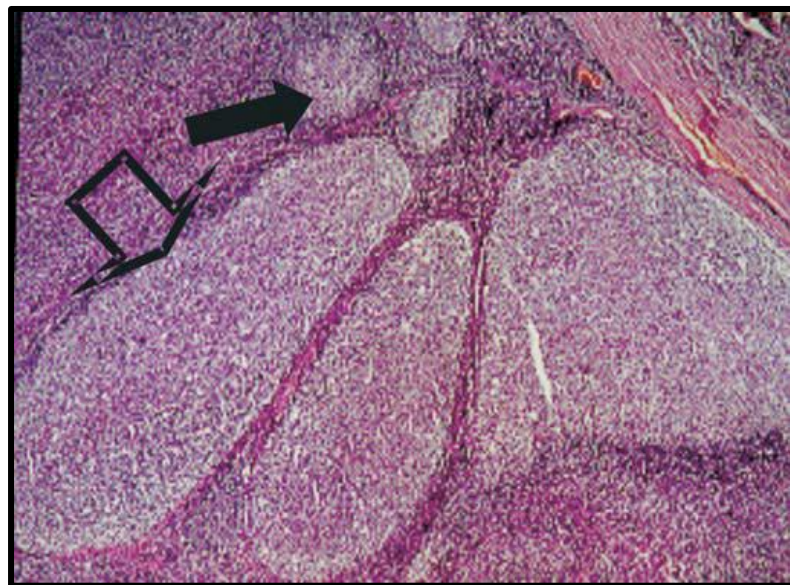


Figura 2: Hiperplasia Folicular Linfóide em Tonsila. A seta cheia indica os folículos normais; a seta vazia indica os folículos hiperplásicos.
Adaptado de Dell'Aringa et al., 2005

3.3 A hiperplasia tonsilar e a inflamação sistêmica

As crianças com SAOS por HT apresentam *status* inflamatório sistêmico exacerbado, com índices séricos elevados de citocinas como TNF-alfa, PCR (Gozal et al., 2007; 2012; Dillon et al., 2007; Bonuck et al., 2009), P-selectina (O'Brien et al., 2006), IL-1, IL-6, IL-10 (Gozal et al., 2008a; 2008b), NGF (Goldbart et al., 2007), trk-A e substância P.

A sobrecarga cardíaca e os altos níveis de citocinas inflamatórias seriam os principais responsáveis pelo surgimento precoce de placas ateromatosas nesses indivíduos. Os níveis de tais citocinas tendem a normalizar após correção do fator causal da SAOS.

Os CysLTs em sangue periférico (Shen et al., 2012), exalado pulmonar (Goldbart et al., 2006) e urina (Kaditis et al., 2009) desses pacientes também se encontram em níveis mais elevados do que os controles. Shen et al. (2014) observam correlação positiva entre a concentração sérica de CysLTs e o IAH.

3.4 Relação entre a hiperplasia tonsilar e as alergias respiratórias

Os principais estudos populacionais que correlacionam a AR e a HT apresentam resultados diversos. Os estudos de Ameli et al. (2014) e de Eren et al. (2015) demonstraram forte correlação inversa entre a HT e AR, com maior gravidade da HT em indivíduos não alérgicos.

Outros artigos mostram que a ocorrência de doenças alérgicas como rinite, asma e urticária é mais frequente entre os pacientes portadores de HT do que na população geral (Ng et al., 2006; Filiaci et al., 1997; Huang et al., 2001; McColley et al., 1997). Modrzinski et al. (2007) descreveram a AR como aparente fator de risco para a hiperplasia tonsilar, bem como o aumento no tamanho do órgão quando as crianças eram expostas a alérgenos específicos, sendo que o uso de corticosteroides nasais restringia parcialmente o aumento.

Evcimik et al. (2015) também mostraram importante correlação positiva entre HT e AR.

3.5 Os receptores de cisteinil-leucotrienos

Os CysLTRs são receptores transmembrana ligados à proteína G e os dois subtipos mais estudados são o CysLTR1 e o CysLTR2.

3.5.1 O CysLTR1

Seu agonista mais potente é o leucotrieno D4 (LTD4), seguido pelo leucotrieno C4 (LTC4) e pelo leucotrieno E4 (LTE4) (Sarau et al., 1999). Está presente em células estruturais da mucosa nasal (Shirasaki et al., 2002; Corrigan et al., 2005), linfócitos periféricos, musculatura lisa, macrófagos e plaquetas (Mita et al., 2001; Zhu et al., 2005). É sensível aos antagonistas de leucotrienos disponíveis para uso clínico (montelucaste, zafirlucaste, pranlucaste, pobilucaste e MK571).

3.5.2 O CysLTR2

LTC4 e LTD4 são agonistas equipotentes, LTE4 se comporta como um agonista parcial (Heise et al., 2000) e não há um antagonista para uso clínico. Também está presente em células estruturais da mucosa nasal (Shirasaki et al., 2002; Corrigan et al., 2005; Figueroa et al., 2003), linfócitos T (Mita et al., 2001), eosinófilos e mastócitos (Mellor et al., 2003).

3.6 Os CysLTRs e a maturação celular

A síntese e liberação dos leucotrienos foram inicialmente relacionadas aos processos alérgicos (Figura 3). Recentes estudos descrevem a via da 5-Lipoxigenase (5-LO) na maturação de células imunes. Nas células dendríticas (DC) há aumento da concentração intracelular de 5-LO, atingindo altos níveis durante sua maturidade. Observou-se também que as DC imaturas expostas a LTC4 apresentam capacidade maior de ativação de linfócitos T citotóxicos do que as DC expostas a ambientes contendo PGE2 (Dannull et al., 2012). Os CysLTs liberados têm ação quimiotática sobre os linfócitos imaturos e potencializam a capacidade ativadora das DC sobre os linfócitos (Thivierge et al., 2009, Spanbroek et al., 2000). Denzlinger et al. (2001) demonstram a ativação de células tronco de medula óssea através via LDT4/ CysLTR1.

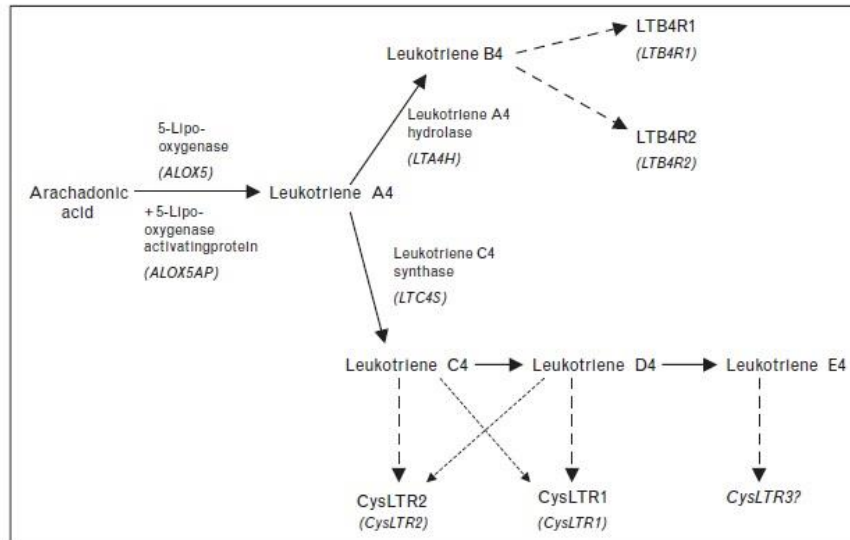


Figura 3: Enzimas envolvidas na síntese dos leucotrienos
Extraído de Scadding et al., (2010)

3.7 Os CysLTRs e a proliferação celular

3.7.1 Neoplasias

A série de estudos publicada por Matsuyama et al. mapearam a expressão dos CysLTRs em neoplasia do trato gênito-urinário masculino. O CysLTR1 estava ausente em próstatas normais e observou-se, respectivamente, discreta e alta expressão desse receptor em órgãos hiperplásicos e tecidos tumorais; a intensidade de expressão foi positivamente correlacionada ao grau da neoplasia (Matsuyama et al., 2007). A presença de montelucaste no meio de cultura das células neoplásicas induziu a apoptose. Em carcinoma de células transicionais de bexiga (Matsuyama et al., 2009a), os autores mostraram comportamento semelhante em relação ao grau de

expressão e resposta ao montelucaste. Em testículos, (Matsuyama et al., 2009b) foi descrita a expressão de CysLTR1 em seminoma, carcinoma embrionário, coriocarcinoma e teratoma. Revendo os resultados, os autores sugeriram a utilização de montelucaste como adjuvante à quimioterapia nesses pacientes (Matsuyama et al., 2010).

Em células de câncer colorretal (Ohd et al., 2003; Soumaoro et al., 2006), a maior concentração de CysLTR1 esteve associada a pior prognóstico, enquanto a expressão elevada de CysLTR2 esteve associada a um bom prognóstico (Magnusson et al., 2010). Em outro estudo, esses autores mostraram que pacientes com tumores de mama com expressão elevada de CysLTR1 e baixa de CysLTR2 apresentaram maior morbidade. O tamoxifeno preservou ou induziu a transcrição de CysLTR2 (Magnusson et al., 2011).

No carcinoma gástrico, há maior expressão de CysLTR1 e semelhante expressão de CysLTR2 em relação ao tecido normal (Venerito et al., 2011). Em células de neuroblastomas, a expressão do CysLTR1 e CysLTR2, bem como das enzimas geradoras de CysLTs estão aumentadas e a cultura dessas células em meios contendo bloqueadores de CysLTRs evidenciou diminuição na divisão celular (Sveinbjörnsson et al., 2008). No cérebro, observou-se alta expressão de CysLTR1 em astrocitomas, gangliogliomas e adenocarcinoma metastáticos (Zhang et al., 2004).

3.7.2 Proliferação não-neoplásica

Na asma, a liberação persistente de CysLTs, em especial a do LTD4 (Panettieri et al., 1998; Espinosa et al., 2003; Bossé et al., 2009; Ravasi et al., 2006), gera hiperplasia das células musculares lisas brônquicas e das células caliciformes, contribuindo para a hiperreatividade brônquica e a hipersecreção mucosa (Hsu et al., 2012; Henderson et al., 2002). Um dos principais resultados desse processo é o remodelamento da via aérea.

Na aterosclerose, os CysLTRs são expressos em células endoteliais e musculares lisas, intermediando a divisão celular e a hiperplasia tecidual (Porreca et al., 1996; Bäck et al., 2006). Por esses motivos, os estudos recentes descrevem a via dos CysLTs como um eixo central na aterogênese e um dos principais focos a serem tratados em portadores de doenças vasculares crônicas (Riccioni et al., 2009).

Segundo McMahon et al. (2000; 2002), durante o desenvolvimento da glomerulonefrite, a proliferação das células mesangiais é induzida por LTD4 e inibida por montelucaste. Os CysLTRs estão envolvidos também na proliferação de mastócitos (Jiang et al., 2006); em epitélio intestinal, o LTD4 age também na mudança do ciclo celular (Paruchuri et al., 2003).

Spinozzi et al. (2004) demonstraram que a ativação de linfócitos T periféricos gera expressão de CysLT1R e CysLT2R. Quando tais linfócitos foram cultivados em ambiente contendo montelucaste, houve diminuição da proliferação celular e indução de apoptose.

3.8 As tonsilas e os leucotrienos

A concentração tecidual de CysLTs é maior nas tonsilas hiperplásicas em relação às tonsilas com infecções recorrentes (Shen et al., 2012). Na zona do manto, há alta expressão de 5-LO, leucotrieno-A4 hidrolase (LTA4H) e leucotrieno-C4 sintase (LTC4S) (Mashid et al., 2009; Tsaoussoglou et al., 2014). Em relação aos CysLTRs em tonsilas, Goldbart et al. (2004) publicou o primeiro estudo, no qual crianças com SAOS foram comparadas com as portadoras de tonsilites de repetição e observou-se expressão significativa de CysLTR1 e CysLTR2 no epitélio, zona extra-folicular e endotélio no grupo com SAOS; no grupo controle, houve fraca expressão. Nesse estudo foram excluídas todas as crianças com antecedente de asma, rinite ou alergias.

Em 2005, o mesmo grupo publicou novo trabalho, nos mesmos moldes do anterior, com maior amostra (Goldbart et al., 2005). Também foram excluídos indivíduos portadores de alergias, e os resultados obtidos na imunohistoquímica foram semelhantes. Nesse estudo, foi realizada terapia oral com montelucaste por 16 semanas em um grupo de portadores de SAOS leve e houve melhora significativa dos padrões polissonográficos.

Em 2008, Kaditis et al. (2008) evidenciou maior presença dos CysLTR1 e CysLTR2 em linfócitos T das zonas extra-foliculares e epiteliais dos pacientes com SAOS, comparados aos indivíduos com tonsilites de repetição. Nesse estudo, os autores não consideraram a história de alergias como critério de exclusão dos pacientes. Em outros estudos recentes (Tsaoussoglou et al., 2012; Shen et al., 2012), que utilizaram citometria de fluxo e dosagem de RNA

em RT-qPCR, observou-se que os resultados se mantiveram, com maior expressão dos receptores em portadores de SAOS.

O estudo de Dayyat et al. (2009) evidenciou com alta significância estatística ($p < 0.001$) o efeito dose-dependente do LTD4 na proliferação de células tonsilares in vitro e mostrou o impacto dos bloqueadores de leucotrienos nesse processo.

3.9 A Fisiopatologia dos DRS pediátricos

Entre 3 e 10 anos, os DRS estão intimamente ligados à HT (Mitchell, 2007). As TP e a TF são órgãos linfáticos secundários presentes na via aérea superior e compõem o anel linfático de Waldeyer. O aumento patológico de volume desses órgãos ocorre em 3 a 5% da população pediátrica (Carter et al., 2014) e gera maior resistência à ventilação, facilitando o colapso faríngeo durante a inspiração. Durante o sono (Bao et al., 2004; Arens et al., 2005a), a hipotonia muscular e o decúbito também colaboram para o estreitamento da via aérea.

Outros importantes fatores envolvidos na fisiopatologia dos DRSs são as malformações crânio-faciais, como aquelas associadas a síndromes genéticas (Down, Crouzon), os distúrbios neurológicos, principalmente as neuropatias hipotônicas (Halbower et al., 2007) e a obesidade (Ievers-Landis et al., 2007).

3.10 Diagnóstico de SAOS na infância

A história e o exame físico são as ferramentas mais úteis para a o diagnóstico dos DRS na maioria das crianças (Ray et al., 2005). Os dados clínicos que mais fortemente apontam correlação com SAOS são a ocorrência de ronco alto, apneia testemunhada, despertares frequentes e respiração oral persistente (Hwang et al., 2013; Tan et al., 2013). Ao exame físico, o grau de hiperplasia da TF tende a se correlacionar com a intensidade da SAOS em crianças pré-escolares. (Tagaya et al., 2012).

A revisão do artigo adotado como diretriz pela *American Academy of Pediatrics* considera a polissonografia noturna (PSG) o método padrão ouro no diagnóstico da SAOS (Marcus et al., 2012) e recomenda sua realização quando há dúvida no diagnóstico desse distúrbio, ponderando a dificuldade na execução desse procedimento em todos os pacientes candidatos a adenotonsilectomia (A2) (Weatherly et al., 2004; Yellon et al., 2010).

3.10.1 O *Pediatric Sleep Questionnaire*

O *Pediatric Sleep Questionnaire* (PSQ) foi desenvolvido por Chervin et al. (2000) e sua versão para o Português foi validada por Certal et al. (2015). Esse teste é aplicado aos pais de indivíduos de 2 a 18 anos com suspeita de SAOS e contém 22 perguntas do tipo sim/não. A ocorrência de 8 ou mais respostas positivas é indicativa de SAOS, com sensibilidade de 85% e

especificidade de 87% e a sensibilidade do teste cresce proporcionalmente ao número de respostas positivas. De acordo com Karlson et al. (2008), o PSQ é o questionário o mais acurado para uso clínico; Rosen et al. (2015) afirmam que o PSQ tem como vantagem fornecer informações a respeito do impacto da SAOS sobre comportamento, sonolência e qualidade de vida da criança e permitir também avaliar a possibilidade de melhora desses sintomas após a A2.

3.11 O Tratamento dos DRSs pediátricos

A A2 é o procedimento mais utilizado por apresentar alta eficácia terapêutica e baixo índice de recidivas (Ray et al., 2005; Bhattacharjee et al., 2011). Outras terapias são as correções de malformações crânio-faciais, uso de máscara nasal de ventilação com pressão positiva e perda ponderal (Praud et al., 2008).

O tratamento medicamentoso baseia-se no uso de anti-inflamatórios, como corticoides (orais e nasais), anti-histamínicos e antileucotrienos (Kuhle et al., 2011; Gozal et al., 2010). Goldbart et al. (2012) compararam terapia oral com montelucaste *versus* placebo durante 12 semanas e observaram melhora no IAO ($p < 0,01$), diminuição do tamanho da TF ($p < 0,05$) e melhora limítrofe do IAH ($p = 0,07$). Esses padrões mantiveram-se estáveis no grupo placebo.

A associação de corticosteroides tópicos nasais com montelucaste também apresentou efeito positivo no tratamento da SAOS leve e moderada (Criscuoli et al., 2003) e da SAOS residual pós-A2 (Arens et al., 2005b; Kheirandish et al., 2006).

4 PACIENTES E MÉTODOS

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Parecer ético

Este estudo foi aprovado pela CAPPesq do HCFMUSP, sob os registros de pesquisa números 10492/14 e 12988/15 (Anexos A e B). Foi registrado na Plataforma Brasil *online* sob o número 13737413.9.0000.0068 e 40593015.8.0000.0068 (Anexo C). Os responsáveis por cada criança envolvida no presente estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 Desenho do estudo

Estudo observacional exploratório do tipo Corte Transversal com dois grupos comparados em relação ao perfil populacional linfocitário.

4.3 Pacientes

Foram incluídos 60 indivíduos consecutivos da lista de espera para realização de adenoamigdalectomia do Ambulatório de Otorrinolaringologia do HCFMUSP.

4.3.1 Definição dos grupos de estudo

Os pacientes foram divididos em dois grupos de 30 indivíduos, de acordo com a resposta ao teste cutâneo para alérgenos inalatórios (TCAI):

Sensibilizados (SE): resposta maior que 3 mm a pelo menos um dos alérgenos.

Não-Sensibilizados (NS): resposta menor que 3 mm a todos os alérgenos testados.

4.3.2 Critérios de inclusão

- Idade maior que 5 e menor que 10 anos completos no dia da cirurgia.
- Roncos noturnos com parada respiratória, com frequência mínima de 4 noites por semana, descritos por acompanhante adulto.
- Índice em PSQ maior ou igual a 8.
- Índice z do IMC entre -2 e +2 seguindo o padrão da OMS para a idade (Coleet al., 2000; Barlow et al., 2007).
- TP grau 2 ou maior (Brodsky et al., 1989) e TF ocupando espaço igual ou maior que 70% do espaço total de rinofaringe (Caylakli et al., 2009; Lertsburapa et al., 2010).

4.3.3 Critérios de exclusão

- Deformidades crânio-faciais de quaisquer etiologias.
- Distúrbios cardiovasculares, imunológicos, neuromusculares ou genéticos.
- Presença de doenças alérgicas (não respiratórias) conhecidas.
- Uso de antileucotrienos, corticosteroide (nasal ou oral), anti-histamínicos, anti-inflamatórios não hormonais ou antibióticos nos 90 dias que antecederam a cirurgia.
- Antecedente de tonsilites de repetição (Marshall et al., 1998).
- Ocorrência de infecção, viral ou bacteriana, nos 90 dias que antecederam a cirurgia.
- Residência fora da região metropolitana de São Paulo.
- No TCAI: (i) ausência de resposta a um controle positivo; (ii) resposta a todos os alérgenos (dermografismo); (iii) qualquer desacordo entre os lados.

4.4 Avaliação clínica

4.4.1 Definição do quadro clínico

Foi aplicada a versão do PSQ em Português aos responsáveis de cada paciente. Foram avaliados os antecedentes pessoais de tonsilites de repetição,

síndromes ou quaisquer outras patologias relevantes. Também foram registradas as medicações de uso habitual e recente.

4.4.2 Exame físico

Os pacientes tiveram suas alturas medidas em posição ortostática e foram pesados utilizando-se uma balança antropométrica da marca Welmy® modelo 110 CH (origem: Brasil). As TP foram avaliadas via oroscopia com paciente sentado sobre as pernas do responsável. Para avaliação da TF, os indivíduos foram submetidos a nasofibroscopia ambulatorial. Inicialmente foram mantidos sentados sobre as pernas do adulto responsável. 0,1 ml de lidocaína 2% em gel (Xylestesin®; origem: Brasil) foi aplicado à ponta do endoscópio Machida® modelo ENT-30FIII (origem: Japão) acoplado a uma fonte de luz halógena da marca Ferrari Medical® modelo FH 25C R1 (origem: Brasil). O aparelho foi introduzido nas duas fossas nasais e o grau de ocupação faríngea pela TF foi avaliado pelo examinador.

4.5 O teste cutâneo para alérgenos inalatórios

Todos os indivíduos foram submetidos a TCAI, realizado pelo mesmo examinador. Os responsáveis foram orientados a cessar o uso de: anti-histamínicos, corticosteroides nasais e orais, antileucotrienos ou anti-

inflamatórios 60 dias antes do teste, quando o quadro clínico permitiu. Todos os alérgenos testados foram fornecidos pela IPI-ASAC do Brasil®, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1: Os extratos de alérgenos utilizados no TCAI

Reagente	Concentração
<i>Lolium Perenne</i>	10.000 PNU/ml
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10.000 PNU/ml
<i>Penicillium notatum</i>	10.000 PNU/ml
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	58.500 UBE/ml
<i>Blomia tropicalis</i>	37.650 UBE/ml
<i>Felis domesticus</i>	94.500 UBE/ml
<i>Canis familiaris</i>	10.000 PNU/ml
<i>Periplaneta Americana</i>	5.000 PNU/ml
<i>Blatella germânica</i>	5.000 PNU/ml
Controle positivo	Histamina 50%, NaCl 0,9%, Fenol 0,4%
Controle negativo	Glicerina 50%, NaCl 0,9%, Fenol 0,4%

As puncturas cutâneas foram realizadas com lanceta descartável de aço inoxidável da marca Alergopricks® modelo PRO (origem: Brasil) na linha mediana das faces anteriores dos antebraços, com distância mínima de 3 cm entre cada reagente. As leituras foram realizadas após 15 min.

Cada pápula foi marcada e medida com régua transparente graduada em milímetros. A reação foi positiva quando o diâmetro da pápula foi igual ou superior a 3 mm, de forma concordante para um dado alérgeno, em ambos os braços. Este diâmetro foi calculado utilizando a fórmula (Quadro 2):

Quadro 2: Fórmula para cálculo do diâmetro da pápula cutânea no TCAI

$$\text{Diâmetro da pápula} = \left[\frac{\text{maior diâmetro} + \text{menor diâmetro}}{2} \right] - (\text{maior diâmetro do controle negativo})$$

4.6 Coleta das amostras teciduais

Todos os pacientes foram submetidos a adenotonsilectomia sob anestesia geral seguindo as técnicas habitualmente utilizadas pelos médicos anestesistas e otorrinolaringologistas do HCFMUSP. Durante a indução anestésica, foram coletados 3 ml sangue venoso periférico e acondicionados em tubo de 4 ml a vácuo contendo anticoagulante EDTA K2 na parede, da marca BD® modelo Vacutainer (origem: Brasil).

Um fragmento das TP e da TF extraídas de cada paciente foram acondicionados em formol 10% e enviados ao Laboratório de Patologia do HCFMUSP para fixação do tecido em parafina e análise histológica habitual. Os demais fragmentos foram alocados em frasco plástico estéril contendo 6 ml de PBS e enviados prontamente ao Laboratório de Imunofenotipagem do HCFMUSP.

4.7 Fixação e avaliação anatomopatológica

Os fragmentos enviados ao Laboratório de Patologia do HCFMUSP foram processados seguindo o protocolo: fixação inicial do tecido em formalina

tamponada neutra por 24h. Após, o espécime é submetido a exame macroscópico, seccionado e incluído em cassete histológico. Os cassetes são incubados em 3 passagens de duas horas cada uma em álcool 96%; em seguida realizam-se 3 passagens de 2 horas cada uma em álcool 100%.

Após, são incubados em xilol, com 3 trocas da solução a cada 1 hora. Em seguida, são incubados em parafina filtrada a 56 °C por uma hora. A parafina é substituída por nova parafina filtrada e mantida a 56 °C por mais 2 horas.

Em seguida, o tecido é seccionado à espessura de 3 µm em micrótomo semi-automático modelo CUT 5062 (origem: Brasil). Os fragmentos da fita de cortes são colocados em banho-maria com água destilada a 45 °C e em seguida alocados em lâmina de vidro para microscopia de 26 x 76 mm com 1 mm de espessura, da marca Bioslide® (origem: Brasil). As lâminas com os cortes são colocadas em estufa a 50° a 60 °C durante 24 h.

Em seguida, as lâminas são imersas em xilol por 20 min, com troca aos 10 min. Em seguida são alocadas em banhos de álcool 100% por 5 min, depois a 95% por mais 5 min e a 70% por 15 min. Após essas etapas são lavadas com água corrente.

As lâminas são então coradas com corante hematoxilina da marca Newprov® (origem: Brasil) por 15 min e lavadas em água corrente por 10 min. Em seguida são coradas com corante eosina da marca Newprov® por 2 min e novamente lavadas em água corrente por mais 10 min. Por fim, são passadas por bateria de desidratação em banhos rápidos sequenciais de: álcool 70%, álcool 95%, álcool 100% e xilol.

Foi feita a análise histológica habitual (em todos os casos pelo mesmo patologista, cego para o grupo ao qual o paciente pertencia) através de microscópio óptico da marca Nikon® modelo Eclipse Ci-S (origem: Japão), iluminação halógena.

4.8 Citometria de fluxo

4.8.1 Identificação das amostras teciduais

Os fragmentos de tecidos foram separados e identificados:

TF- Fragmentos de tonsila faríngea

TP- Fragmentos das tonsilas palatinas

SP- Sangue periférico

4.8.2 Preparo dos tecidos tonsilares

Os fragmentos de TF e TP foram colocados sobre uma placa de Petry contendo 4 ml de PBS e a dissociadas mecanicamente através de múltiplas incisões e lavagens no tecido com uso de lâmina de bisturi estéril número 15 da marca Solidor® (origem: Brasil). Ao final dessa etapa obtivemos 10 ml de suspensão celular de TF e TP.

As suspensões obtidas foram passadas através de um filtro modelo EASYstrainer da marca Greiner Bio-One® (origem: Brasil) com porosidade de 100 µm e em seguida acondicionadas em tubos de 5 ml da marca BD®, modelo Falcon (origem: Brasil) e identificadas como TF e TP. Um dos tubos da amostra TF foi utilizado para RT-qPCR (adiante).

Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3175 rpm em centrífuga modelo Immufuge II da marca Baxter® (origem: EUA) durante 5 min. As soluções sobrenadantes foram descartadas. Foram então adicionados 3 ml de PBS a cada tubo, homogeneizados em agitador vórtex modelo AP 56 da marca Phoenix® (origem: Brasil) e novamente centrifugados a 3175 rpm. Novamente os sobrenadantes foram descartados e as células foram ressuspensas em 1600 µl de PBS-BSA e homogeneizadas em vórtex.

4.8.3 A viabilidade celular

10 µl de cada suspensão foram adicionados a 10 µl de solução de azul de tripano a 0,2% da marca Life Technologies® (origem: EUA), homogeneizadas e alocadas em hemocitômetro. Em seguida foram avaliados em microscópio óptico da marca Nikon® modelo Eclipse Ci-S (origem: Japão), iluminação halógena. Todas as amostras analisadas apresentaram pelo menos 97% de células viáveis.

4.8.4 Separação dos linfócitos de sangue periféricos

O tubo contendo a amostra de SP foi inicialmente homogeneizado por inversão e centrifugado a 3175 rpm durante 5 min. Foi aspirada a fase linfocitária (intermediária) e transferida para um novo tubo. A esse tubo foram adicionados 2 ml de PBS, homogeneizado em vórtex e novamente centrifugado a 3175 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi então aspirado e as células foram ressuspensas em 1600 µl de PBS-BSA e homogeneizadas em vórtex.

4.8.5 Marcação dos tubos

500 µl de cada suspensão celular (SP, TP e TF) foram colocados em 3 novos tubos Falcon®, marcados como:

Controle: Tubo ao qual não foram adicionados anticorpos.

LT1: Tubo ao qual foram adicionados os marcadores para CysLTR1, CD3 e CD19.

LT2: Tubo ao qual foram adicionados os marcadores para CysLTR2, CD3 e CD19.

4.8.6 Adição dos anticorpos

Nos tubos LT1 foram adicionados 2 µl do anticorpo monoclonal primário de coelho anti-CysLTR1 humano da Marca Cayman Chemical® (origem: EUA) em diluição 1:100.

Nos tubos LT2 foram adicionados 2 µl do anticorpo monoclonal primário de coelho anti-CysLTR2 humano da Marca Cayman Chemical® (origem: EUA) em diluição 1:100.

Os tubos foram então incubados por imersão a 0 °C durante 20 min em caixa isenta de luz. Em seguida, aos tubos LT1 e LT2 foram adicionados 2 µl do anticorpo policlonal secundário: imunoglobulina de cabra anti-coelho conjugado a FITC da marca BD® (origem: EUA) em diluição 1/500. Todos os tubos foram então novamente incubados a 0 °C durante 40 min em caixa isenta de luz.

Após esse período, os tubos foram centrifugados a 3175 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados 500 µl de PBS a cada tubo e homogeneizados em vórtex.

Aos tubos LT1 e LT2 foram então adicionados:

- 2 µl de anticorpo IgG1 monoclonal de rato anti-CD19 humano, clone ID LT-19, concentração 1/100 e conjugado ao cromóforo PerCP (Exbio®- origem: República Tcheca).

- 5 µl de anticorpo IgG1 monoclonal de rato anti-CD3 humano, clone ID MEM-57, em concentração 1/200 e conjugado ao cromóforo PE. (Exbio®- origem: República Tcheca).

Os tubos foram então homogeneizados em vórtex e incubados em câmara escura durante 15 min a temperatura ambiente.

Após esse período, foram adicionados 2 ml de solução de lise celular Excellyse da marca Exbio® (origem: República Tcheca) a cada tubo. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados em câmara escura por mais 15 min a temperatura ambiente.

Em seguida, os tubos foram homogeneizados em vórtex e centrifugados a 3175 rpm durante 3 min. O sobrenadante foi desprezado e foram então realizadas duas lavagens do *pellet* com solução PBS-Azida 0,1%. Por fim, as células foram ressuspensas em PBS e as soluções foram lidas em citômetro de fluxo.

4.8.7 Leitura e análise das amostras em citômetro de fluxo

As amostras foram levadas para leitura em um citômetro de fluxo modelo FACSCalibur da marca BD® (origem: EUA) que estava conectado a um computador modelo MacPro8 da marca Apple® (origem: EUA). Foi utilizado o software de leitura da marca CellQuest® modelo PRO (origem: EUA), padronizado pela empresa BD®.

Para cada amostra, foram feitos os seguintes ajustes antes da leitura:

- Com o tubo controle:

- a) Padronização de aquisição de 50.000 eventos.

- b) Ajuste de FSC e SSC: deixando a amostra em campo habitual do *plot*.
- c) Ajuste do *gate* populacional: Nas amostras TF e TP, foram estudadas separadamente as células pequenas (PC), as grandes (GC) e o total de células (TC) (Figura 4). Nas amostras SP, o *gate* foi alocado na região de células de menor tamanho e granulação (Figura 5).
- d) Ajustagem de FL1, FL2 e FL3: de modo a posicionar as populações controle totalmente dentro dos quadrantes inferiores esquerdos em cada *plot* de estudo.

- Com o tubo LT1 de cada amostra:

- a) Ajustes de FL1, FL2 e FL3.
- b) Ajuste das relações FL1%-FL2, FL3-%FL2 e FL2-%FL3.
- c) Confirmação desse padrão nos tubos LT2.

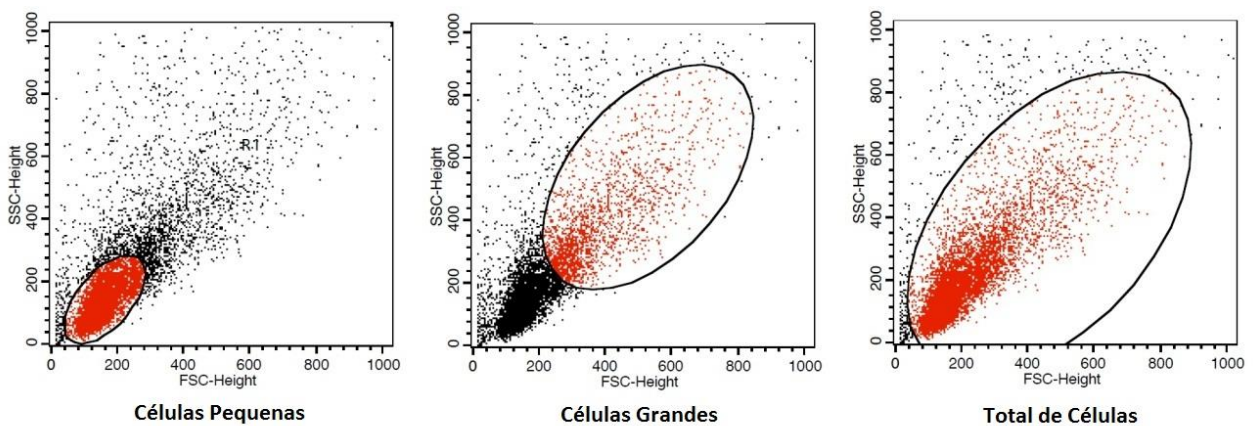


Figura 4: Análise da população celular de TF em citometria de fluxo. Os conjuntos de células pequenas, grandes e totais foram avaliados separadamente

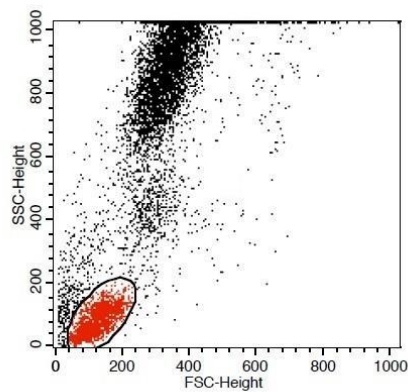


Figura 5: Análise das populações de leucócitos em sangue periféricos por citometria de fluxo. Os LPs estão localizados na área circulada

Terminados esses ajustes, as amostras foram adquiridas e os dados armazenados na memória do computador.

A análise das amostras foi feita utilizando o mesmo *software*. Para cada amostra (SP, TF e TP) de um paciente, foram feitas análises distintas. Inicialmente foi delimitado o *gate* a ser estudado. Em seguida, foram alocados os *markers* nas amostras controle, deixando pelo menos 99,95% dos eventos nos quadrantes inferiores esquerdos. Em seguida, os *markers* foram aplicados para os *plots* contendo as populações celulares em estudo, de forma a obtermos os percentis celulares que expressam CD3 apenas, CD19 apenas, CD3/ CysLTR1, CD19/CysLTR1, CD3/CysLTR2, CD19/CysLTR2 (Figura 6).

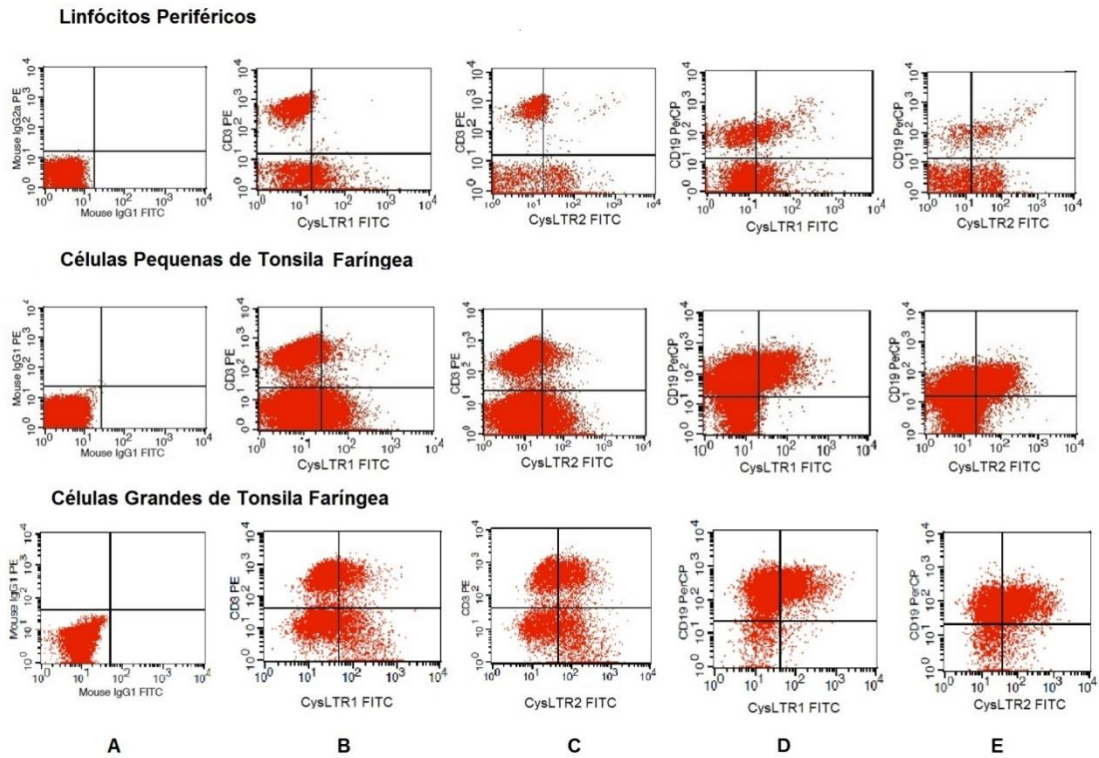


Figura 6: Proporções de células T e B CysLTR+. A coluna A mostra a alocação do *marker*, as colunas B, C, D e E mostram respectivamente células CD3+/CysLTR1+, CD3+/CysLTR2+, CD19+/CysLTR1+ e CD19+/CysLTR2+ nos quadrantes superiores direitos

4.9 RT-qPCR

4.9.1 Extração do RNA total

Em um tubo Falcon estéril de 10 ml da marca BD® (origem: Brasil) foram adicionados sequencialmente 5 ml de solução Ficoll Paque da GE Healthcare® (origem: EUA) e 5 ml de suspensão de células TF. A suspensão foi centrifugada por 20 min a 2000 rpm em temperatura ambiente, em modo de desaceleração sem frenagem. Em seguida, a fase leucocitária (intermediária)

foi transferida para um novo tubo e a solução ressuspensa em 10 ml de PBS, homogeneizada em vórtex e novamente centrifugada a 2000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado por inversão, o sedimento foi novamente ressuspensa em 10 ml de PBS, homogeneizado em vórtex e novamente centrifugado a 2000 rpm durante 10 min. A partir do sedimento obtido, o RNA total foi extraído com RNeasy Mini Kit da Qiagen® (origem: EUA) de acordo com as instruções do fabricante (Anexo D). A concentração e a pureza de RNA obtidos foram avaliadas em espectrofotômetro (Modelo NanoDrop 2000c-Thermo Scientific®, origem: EUA).

4.9.2 Síntese de cDNA

Alíquotas de 1,0µg de RNA total foram submetidas a transcrição reversa para cDNA usando o kit Superscript III da marca Invitrogen® (origem: EUA), de acordo com as orientações do fabricante (Anexo E).

4.9.3 Amplificação

Um volume de cDNA equivalente a 20 ng de RNA total foi submetido a RT-qPCR em triplicata no 7500 Fast PCR real time (Applied Biosystems®, origem: EUA), na concentração inicial e em dissolução de 1/10, 1/100, 1/1000 e

1/10.000. Foi utilizado o kit SYBR® Green PCR Master Mix- Invitrogen®, origem: EUA. O protocolo do fabricante encontra-se no Anexo F.

Os *primers* de PCR para CysLTR1, CysLTR2, e β -actina (Invitrogen®, origem: EUA) estão descritos no Quadro 3:

Quadro 3: *Primers* utilizados na amplificação de CysLTR1, CysLTR2, e β -actina

CysLTR1	<i>forward primer</i>	5'-TGACCGCTGCCTTTTTAGTC-3'
	<i>reverse primer</i>	5'-AGGAGAGGGTCAAAGCAACA-3'
CysLTR2	<i>forward primer</i>	5'-TCCACTTGACGACATGGAAA-3'
	<i>reverse primer</i>	5'-GGCCTTTTCTGAGTGCAGAC-3'
β -actina	<i>forward primer</i>	5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'
	<i>reverse primer</i>	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

As condições de ciclo consistiram de um ciclo a 95 °C durante 3 min, 40 ciclos (95 °C durante 30s, 60 °C durante 60 s), e o ciclo final de dissociação (95 °C durante 60 s e o aumento passo a passo de 55 para 95 °C). Cada um dos limiares do ciclo calculados para CysLTR1 CysLTR2 e foram normalizados em relação ao limiar de ciclo de β -actina correspondente. Assim, CysLTR1 e CysLTR2 foram expressos como razões do gene de interesse para o valor o valor β -actina correspondente. Os resultados da RT-qPCR foram analisados usando Software 7500 (Applied Biosystems®, origem: EUA).

Os métodos utilizados estão resumidos na Figura 7:

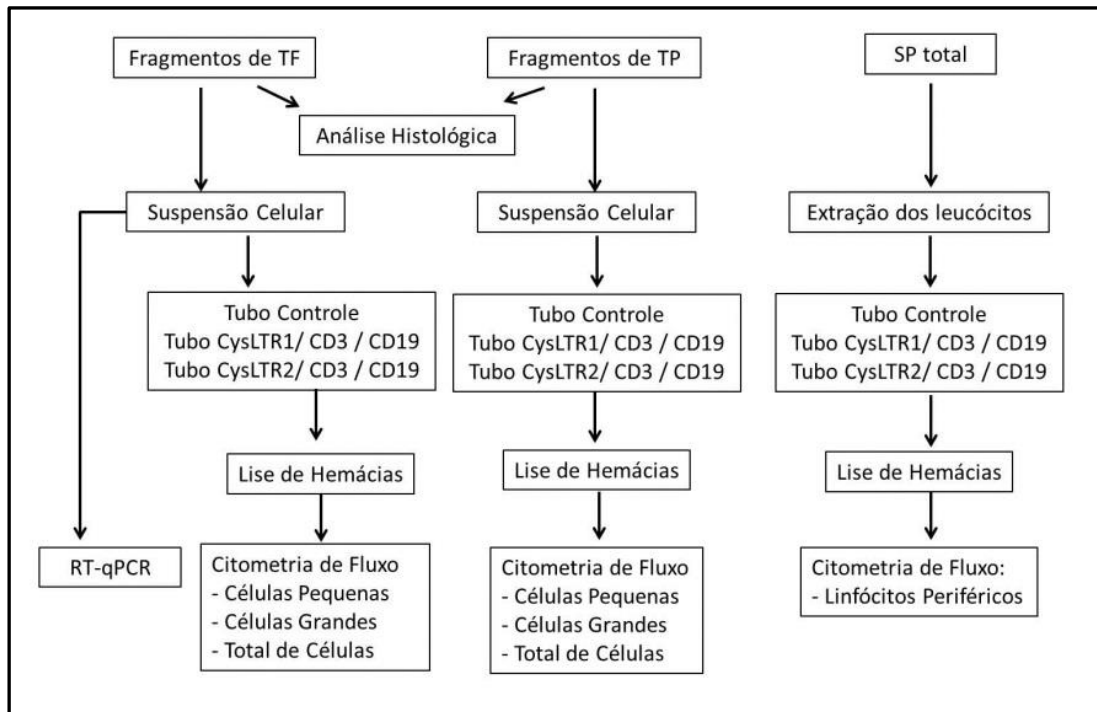


Figura 7: Resumo da metodologia utilizada no presente estudo

4.10 Análises de dados

Os dados obtidos foram comparados usando-se o Teste t de Student para comparação de médias de variáveis contínuas e o Teste Qui-quadrado para as comparações de variáveis categóricas. As análises de multivariáveis foram feitas através do teste ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey. As correlações foram medidas através do coeficiente de correlação de postos de Spearman. Adotou-se $p < 0,05$ como padrão de significância. A expressão genética e fenotípica de CysLTR1 e CysLTR2 foram os principais desfechos deste estudo.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Descrição da amostra

Trinta crianças foram incluídas em cada grupo. As características clínicas dos indivíduos estão apresentadas na Tabela 1. Não houve diferença estatística entre idade, sexo, IMC (kg/m²), IMC (índice z), grau de oclusão faríngea e tamanho de TP. As crianças do grupo SE diferiram das NS por apresentarem reações positivas para um ou mais alérgenos testados e índice superior no PSQ ($p=0.05$).

Tabela 1: Características clínicas da população em estudo

	SE (n=30)	NS (n= 30)	p
Idade em anos (média \pm dp)	7,5 \pm 1,5	7,7 \pm 1,3	0,34*
Sexo masculino (%)	18 (60)	11 (36)	0,48**
Pontuação no PSQ (média \pm dp)	13,5 \pm 2,2	12,0 \pm 2,0	0,05*
IMC - kg/m ² (média \pm dp)	16,6 \pm 1,6	17,0 \pm 1,8	0,73*
IMC - índice z (média \pm dp)	0,8 \pm 1,3	0,9 \pm 1,2	0,58**
Grau de hiperplasia de TP (média \pm dp)	3,6 \pm 0,5	3,9 \pm 0,6	0,18**
% oclusão de rinofaringe por TF (média \pm dp)	78,6 \pm 9,1	78,3 \pm 9,8	0,69*
Número de alérgenos reagentes no TCAI (média \pm dp)	1,6 \pm 0,6	0 \pm 0	<0,001**

*teste t de student

** teste Chi quadrado

5.2 Correlações clínicas

Nos dois grupos foram observadas correlações pequenas entre as principais características clínicas dos indivíduos (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Correlações entre os dados clínicos dos pacientes do grupo SE

	Pontuação no PSQ	% oclusão de rinofaringe por TF	Grau de hiperplasia de TP
% oclusão de rinofaringe por TF	(0,09)	1	(X)
Grau de hiperplasia de TP	(0,09)	(0,14)	1
Número de alérgenos reagentes no TCAI	(0,14)	0,18	(0,34)

Teste: coeficiente de correlação de postos de Spearman

Tabela 3: Correlações entre os dados clínicos dos pacientes do grupo NS

	Pontuação no PSQ	% oclusão de rinofaringe por TF
% oclusão de rinofaringe por TF	0,08	1
Grau de hiperplasia de TP	(0,18)	0,03

Teste: coeficiente de correlação de postos de Spearman

5.3 Citometria de fluxo

5.3.1 Comparações das expressões de CysLTR1 e CysLTR2 em SE e NS

5.3.1.1 Células de TF

No grupo de células pequenas, crianças NS tiveram expressões mais elevadas de CysLTR1 e CysLTR2 em todas as subpopulações celulares, sendo significativa para linfócitos CD3+/CysLTR1+. Houve também expressão mais elevada de CysLTRs entre as grandes células de indivíduos NS, significativa para linfócitos CD3+/CysLTR1+, CD19+/CysLTR1+ e CD19+/CysLTR2+. Finalmente, considerando-se todas as células, foi novamente significativa a maior expressão de CysLTR1 em linfócitos T de NS (Tabela 4).

5.3.1.2 Células de TP

As células de TP também apresentaram maior expressão de CysLTRs entre os NS, sendo essa diferença significativa entre as células CD19+/CysLTR1+ pequenas e grandes (Tabela 5).

5.3.1.3 Sangue periférico

A Tabela 6 mostra os percentis de cada subpopulação estudada. Não houve tendência a maior expressão de um dos receptores, bem como não houve diferença estatística entre as médias.

Tabela 4: Diferenças entre a expressão de CysLTR1 e de CyLTR2 em linfócitos de tonsilas faríngeas dos indivíduos SE e NS

	SE (n=30) média ±dp	NS (n= 30) média ±dp	p*	
CÉLULAS PEQUENAS	% do total de células da TF	73,6 ±6,3	71,3 ±9,6	0,28
	% células CD3+	32,5 ±6,0	32,7 ±3,0	0,87
	% de células CD3+ expressando CysLT1R	4,6 ±2,2	6,5 ±5,0	0,04
	% de células CD3+ expressando CysLT2R	9,5 ±4,8	11,6 ±7,9	0,23
	% células CD19+	56,1 ±11,4	54,7 ±10,5	0,61
	% de células CD19+ expressando CysLT1R	30,6 ±16,3	36,2 ±13,7	0,15
	% de células CD19+ expressando CysLT2R	37,2 ±17,1	42,1 ±16,1	0,25
CÉLULAS GRANDES	% do total de células da TF	19,5 ±4,4	20,5 ±4,5	0,36
	% células CD3+	20,5 ±7,5	30,0 ±8,6	0,09
	% de células CD3+ expressando CysLT1R	40,9 ±14,5	47,6 ±11,7	0,05
	% de células CD3+ expressando CysLT2R	52,2 ±12,2	56,1 ±11,3	0,20
	% células CD19+	61,1 ±8,0	61,5 ±5,3	0,82
	% de células CD19+ expressando CysLT1R	44,6 ±16,9	54,1 ±12,4	0,01
	% de células CD19+ expressando CysLT2R	55,3 ±11,3	61,5 ±12,6	0,05
TODAS CÉLULAS	% do total de células da TF	93,7 ±2,1	93,7 ±2,8	0,97
	% células CD3+	33,5 ±6,6	36,4 ±7,8	0,11
	% de células CD3+ expressando CysLT1R	11,1 ±5,5	13,7 ±6,2	0,04
	% de células CD3+ expressando CysLT2R	17,0 ±7,5	19,2 ±8,3	0,28
	% células CD19+	53,7 ±11,6	53,1 ±11,2	0,82
	% de células CD19+ expressando CysLT1R	27,0 ±12,0	32,2 ±12,0	0,06
	% de células CD19+ expressando CysLT2R	36,2 ±11,0	40,3 ±15,0	0,23

* teste t de Student.

Tabela 5: Diferenças entre a expressão de CysLTR1 e de CysLTR2 em linfócitos de tonsilas palatinas dos indivíduos SE e NS

	SE (n=30) média ±dp	NS (n= 30) média ±dp	p*	
CÉLULAS PEQUENAS	% do total de células da TP	67,7 ±7,9	68,3 ±6,3	0,20
	% células CD3+	31,4 ±6,0	39,3 ±14,2	0,006
	% de células CD3+ expressando CysLTR1	4,8 ±2,6	5,8 ±5,0	0,30
	% de células CD3+ expressando CysLTR2	10,1 ±4,2	10,5 ±6,1	0,74
	% células CD19+	50,6 ±13,3	51,4 ±9,2	0,79
	% de células CD19+ expressando CysLTR1	22,3 ±13,0	28,2 ±13,5	0,05
	% de células CD19+ expressando CysLTR2	34,0 ±13,4	36,7 ±13,0	0,43
CÉLULAS GRANDES	% do total de células da TP	22,1 ±6,2	23,4 ±6,7	0,43
	% células CD3+	24,8 ±7,4	25,7 ±6,1	0,60
	% de células CD3+ expressando CysLTR1	34,8 ±14,8	38,2 ±9,8	0,30
	% de células CD3+ expressando CysLTR2	50,4 ±13,5	52,1 ±9,0	0,85
	% células CD19+	64,2 ±9,0	66,3 ±6,4	0,66
	% de células CD19+ expressando CysLTR1	37,1 ±17,4	44,6 ±12,1	0,05
	% de células CD19+ expressando CysLTR2	50,4 ±15,5	54,9 ±10,9	0,20
TODAS CÉLULAS	% do total de células da TP	92,6 ±2,9	92,2 ±2,7	0,53
	% células CD3+	33,2 ±5,6	38,3 ±8,0	0,005
	% de células CD3+ expressando CysLTR1	11,7 ±6,4	13,0 ±6,0	0,41
	% de células CD3+ expressando CysLTR2	19,2 ±8,7	19,5 ±7,5	0,88
	% células CD19+	50,8 ±12,0	51,3 ±9,4	0,84
	% de células CD19+ expressando CysLTR1	23,7 ±13,0	27,0 ±12,0	0,30
	% de células CD19+ expressando CysLTR2	35,9 ±13,4	37,6 ±13,0	0,62

* teste t de Student.

Tabela 6: Diferenças entre a expressão de CysLTR1 e de CysLTR2 em linfócitos de sangue periférico dos indivíduos SE e NS

	SE (n=30) média ±dp	NS (n= 30) média ±dp	p*
% do total de leucócitos	29,0 ±11,8	31,6 ±12,6	0,41
% células CD3+	67,8 ±10,0	67,2 ±9,5	0,82
% de células CD3+ expressando CysLT1R	1,3 ±1,5	0,8 ±0,4	0,09
% de células CD3+ expressando CysLT2R	12,9 ±9,5	12,3 ±10,2	0,82
% células CD19+	14,6 ±5,1	13,7 ±5,9	0,53
% de células CD19+ expressando CysLT1R	61,3 ±21,8	67,1 ±13,9	0,22
% de células CD19+ expressando CysLT2R	72,6 ±17,3	71,6 ±18,3	0,83

* teste t de Student.

5.3.2 Expressão de CysLTR1 versus CysLTR2

A expressão de CysLTR1 foi comparada à de CysLTR2 na TF separadamente nos grupos de SE e NS. Observou-se maior expressão de CysLTR2 em todas as células estudadas, com exceção de células pequenas CD19+ em ambos os grupos (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7: Expressão de CysLTR1 versus CysLTR2 em indivíduos SE

	Células CD3+		p*	Células CD19+		p*
	CysLTR1+ (n=30)	CysLTR2+ (n=30)		CysLTR1+ (n=30)	CysLTR2+ (n=30)	
PC (média ±dp)	4,7 ±2,3	9,6 ±4,8	<0,01	30,6 ±16,2	37,2 ±17,1	0,07
GC (média ±dp)	40,9 ±14,5	52,2 ±12,2	<0,01	44,6 ±16,9	55,3 ±11,3	<0,01
TC (média ±dp)	11,1 ±5,5	17,0 ±7,5	<0,01	27,0 ±12,0	36,2 ±11,0	<0,01

* teste t de Student.

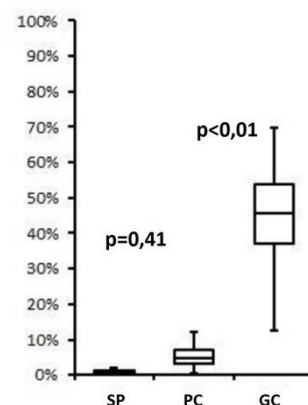
Tabela 8: Expressão de CysLTR1 versus CysLTR2 em indivíduos NS

	Células CD3+			Células CD19+		
	CysLTR1+ (n=30)	CysLTR2+ (n=30)	p*	CysLTR1+ (n=30)	CysLTR2+ (n=30)	p*
PC (média ±dp)	6,6 ±5,1	11,6 ±7,9	<0,01	36,2 ±13,7	42,1 ±16,1	0,12
GC (média ±dp)	47,6 ±11,7	56,1 ±11,3	<0,01	54,1 ±12,4	61,5 ±12,6	<0,01
TC (média ±dp)	13,7 ±6,2	19,2 ±8,3	<0,01	32,2 ±12,0	40,3 ±15,0	<0,01

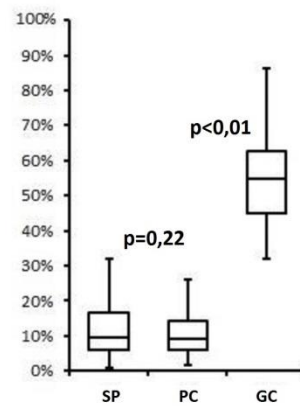
* teste t de Student.

5.3.3- Expressão de CysLTRs nos diferentes estágios de diferenciação celular

Avaliando todos os indivíduos em um único grupo, observou-se que entre as células CD3+ há maior exposição de ambos CysLTRs nas células grandes de tonsilas. As células pequenas apresentaram expressão intermediária e a menor expressão foi observada nos linfócitos de SP (Gráficos 1 e 2).

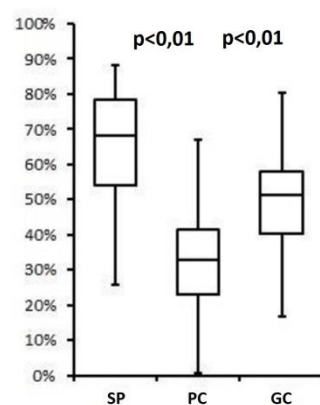
Gráfico de caixas 1: Percentis de células CD3+/CysLTR1+ em SP, PC e GC

Testes: ANOVA e Tukey

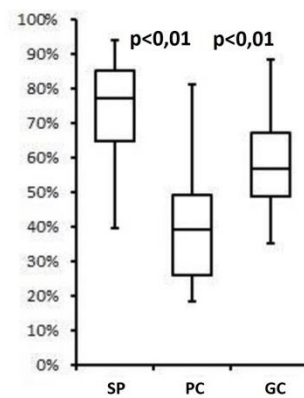
Gráfico de caixas 2: Percentis de células CD3+/CysLTR2+ em SP, PC e GC

Testes: ANOVA e Tukey

As células CD19+ apresentaram maior exposição de CysLTR1 e CysLTR2 no sangue periférico. A menor expressão ocorreu entre as células tonsilares pequenas e as células grandes apresentaram expressão intermediária (Gráficos 3 e 4).

Gráfico de caixas 3: Percentis de células CD19+/CysLTR1+ em SP, PC e GC

Testes: ANOVA e Tukey

Gráfico de caixas 4: Percentis de células CD19+/CysLTR2+ em SP, PC e GC

Testes: ANOVA e Tukey

Quando os indivíduos foram divididos entre SE e NS, o perfil celular permanece semelhante, com maior expressão de CysLTRs em células grandes CD3+ e em linfócitos periféricos CD19+ (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9: Análise multivariada da expressão dos CysLTRs em SP, PC e GC nos indivíduos SE

	F*	p*	SP vs PC**	SP vs GC**	PC vs GC**
CD3+/CysLTR1+	481,3	<0,01	0,38	<0,01	<0,01
CD3+/CysLTR2+	387,5	<0,01	0,19	<0,01	<0,01
CD19+/CysLTR1+	48,8	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
CD19+/CysLTR2+	68,6	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

n=30

*ANOVA

** Teste de Tukey

Tabela 10: Análise multivariada da expressão dos CysLTRs em SP, PC e GC nos indivíduos NS

	F*	p*	SP vs PC**	SP vs GC**	PC vs GC**
CD3+/CysLTR1+	507,8	<0,01	0,51	<0,01	<0,01
CD3+/CysLTR2+	402,2	<0,01	0,30	<0,01	<0,01
CD19+/CysLTR1+	55,8	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
CD19+/CysLTR2+	60,7	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

n=30

*ANOVA

** Teste de Tukey

5.4 RT-qPCR

Considerando-se o total de células de TF, a expressão de RNAm de CysLTR1 e de CysLTR2 padronizadas contra a expressão de RNAm de β -actina não foi significativamente diferente entre os grupos (Tabela 11). As curvas de padronização de Ct encontram-se nos Anexos G, H e I.

Tabela 11: Expressão gênica relativa de CysLTR1 e CysLTR2 em relação a β -actina

	SE (n=22) média \pm dp	NS (n=23) média \pm dp	p*
RNAm CysLT1R/ β -actina	1,17 \pm 0,70	0,99 \pm 0,62	0,37
RNAm CysLT2R/ β -actina	0,42 \pm 0,78	0,91 \pm 1,47	0,17

* teste t de Student.

5.5 Testes de correlação

5.5.1 Correlações clínico-celulares

Relacionando as expressões celulares com as principais características clínicas, não houve correlações fortes, mostrando independência entre as medidas (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12: Correlações entre os achados clínicos e a expressão dos CysLTRs nas subpopulações celulares de indivíduos SE

		Pontuação no PSQ	% de oclusão de rinofaringe por TF	Grau de hiperplasia de TP	Número de alérgenos reagentes no TCAI
CÉLULAS PEQUENAS	% células CD3+/CysLTR1+	0,00	0,04	(0,39)	0,28
	% células CD3+/CysLTR2+	0,11	0,15	(0,20)	0,34
	% células CD19+/CysLTR1+	(0,28)	(0,23)	(0,18)	0,13
	% células CD19+/CysLTR2+	0,00	0,01	(0,33)	0,35
CÉLULAS GRANDES	% células CD3+/CysLTR1+	0,02	0,02	(0,32)	0,06
	% células CD3+/CysLTR2+	0,24	0,01	(0,18)	0,23
	% células CD19+/CysLTR1+	(0,12)	(0,14)	(0,14)	0,02
	% células CD19+/CysLTR2+	0,10	(0,05)	(0,02)	0,16
TODAS CÉLULAS	% células CD3+/CysLTR1+	(0,02)	(0,01)	(0,28)	0,16
	% células CD3+/CysLTR2+	0,09	0,08	(0,18)	0,31
	% células CD19+/CysLTR1+	(0,27)	(0,17)	(0,17)	0,16
	% células CD19+/CysLTR2+	(0,07)	0,01	(0,22)	0,25
SANGUE PERIFÉRICO	% células CD3+/CysLTR1+	0,17	(0,03)	(0,07)	0,48
	% células CD3+/CysLTR2+	(0,06)	(0,36)	0,15	0,01
	% células CD19+/CysLTR1+	(0,35)	0,14	(0,20)	0,36
	% células CD19+/CysLTR2+	(0,33)	(0,04)	(0,41)	0,22

n=30

Teste: coeficiente de correlação de postos de Spearman

Tabela 13: Correlações entre os achados clínicos e a expressão dos CysLTRs nas subpopulações celulares de indivíduos NS

		Pontuação no PSQ	% de oclusão de rinofaringe por TF	Grau de hiperplasia de TP
CÉLULAS PEQUENAS	% células CD3+/CysLTR1+	0,00	(0,14)	0,15
	% células CD3+/CysLTR2+	(0,09)	(0,12)	0,14
	% células CD19+/CysLTR1+	(0,20)	(0,36)	0,17
	% células CD19+/CysLTR2+	(0,16)	(0,41)	0,15
CÉLULAS GRANDES	% células CD3+/CysLTR1+	(0,03)	0,13	0,14
	% células CD3+/CysLTR2+	0,13	(0,13)	0,21
	% células CD19+/CysLTR1+	(0,07)	(0,28)	0,02
	% células CD19+/CysLTR2+	0,05	(0,23)	(0,03)
TODAS CÉLULAS	% células CD3+/CysLTR1+	(0,18)	(0,25)	0,06
	% células CD3+/CysLTR2+	(0,14)	(0,18)	0,00
	% células CD19+/CysLTR1+	(0,21)	(0,36)	0,20
	% células CD19+/CysLTR2+	(0,18)	(0,36)	0,12
SANGUE PERIFÉRICO	% células CD3+/CysLTR1+	(0,12)	(0,41)	(0,16)
	% células CD3+/CysLTR2+	0,02	(0,17)	0,04
	% células CD19+/CysLTR1+	(0,02)	(0,27)	(0,02)
	% células CD19+/CysLTR2+	(0,03)	(0,33)	(0,31)

n=30

Teste: coeficiente de correlação de postos de Spearman

5.5.2 Correlações entre a expressão celular e a expressão genética

Foram testadas as correlações entre a expressão de RNAm para os genes em estudo e os percentis de células expressando cada CysLTR (Tabela

14). Os valores obtidos de rho (significância de 0,05) não evidenciam correlação entre tais medidas.

Tabela 14: Correlações entre a expressão dos CysLTRs em cada subpopulação celular com as expressões gênicas em indivíduos SE

		CysLT1R/ β -actina	CysLT2R/ β -actina
CÉLULAS PEQUENAS	% células CD3+/CysLTR1+	0,20	(0,20)
	% células CD3+/CysLTR2+	0,12	(0,22)
	% células CD19+/CysLTR1+	0,05	(0,07)
	% células CD19+/CysLTR2+	0,16	(0,04)
CÉLULAS GRANDES	% células CD3+/CysLTR1+	0,01	(0,07)
	% células CD3+/CysLTR2+	(0,13)	(0,11)
	% células CD19+/CysLTR1+	0,01	(0,02)
	% células CD19+/CysLTR2+	(0,02)	(0,04)
TODAS CÉLULAS	% células CD3+/CysLTR1+	0,11	(0,12)
	% células CD3+/CysLTR2+	0,12	(0,06)
	% células CD19+/CysLTR1+	0,15	(0,07)
	% células CD19+/CysLTR2+	0,15	(0,11)
SANGUE PERIFÉRICO	% células CD3+/CysLTR1+	0,21	0,17
	% células CD3+/CysLTR2+	(0,05)	(0,22)
	% células CD19+/CysLTR1+	(0,05)	(0,09)
	% células CD19+/CysLTR2+	0,13	0,02

n=30

Teste: coeficiente de correlação de postos de Spearman

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 O perfil populacional

Os grupos apresentaram características clínicas homogêneas em relação à idade, ao gênero e índice z médio do IMC. A evidente hiperplasia de TF (grau médio de oclusão faríngea de 78%) e a hiperplasia de TP (grau médio de 3,6 em SE e 3,9 em NS) caracterizaram a HT como a principal razão para a ocorrência de SAOS.

Houve fracas correlações entre o grau de hiperplasia de TF e TP (Tabelas 2 e 3) e a pontuação no PSQ. Esse dado está de acordo com os estudos prévios que mostram independência entre o tamanho das tonsilas e o IAH (Hwang, 2013; Leitzen, 2014). A revisão sistemática de Nolan et al. (2011) concluiu que os clínicos devem ponderar a fraca associação entre o grau de HT e o IAH no momento da decisão pela abordagem cirúrgica. Nossos dados também corroboram os achados de Tagaya et al., (2012), que sugerem associação entre o grau de HT e o IAH, em crianças pré-escolares e associação fraca em crianças maiores que 5 anos.

Observou-se também fraca correlação entre o número de testes positivos no TCAI e o grau de HT. Considerando que a média de testes positivos entre os SE foi de $1,6 \pm 0,6$, os testes de correlação têm seu valor limitado, devido à baixa média de testes positivos na amostra.

Os estudos prévios sobre a expressão de CysLTRs em tonsilas haviam comparado pacientes portadores de SAOS com indivíduos portadores de tonsilites de repetição, demonstrando mínima expressão dos receptores de cisteinil-leucotrienos no segundo grupo (Goldbart et al., 2004; 2005; Shen et al., 2012). Os dados sobre o perfil celular de tonsilas sem hiperplasia são escassos, uma vez que tal tecido não é disponível para ser removido, por razões éticas. Considerou-se, *a priori*, que a utilização de indivíduos portadores de tonsilite de repetição como controles de portadores de HT tem um valor científico relativo, pois a ocorrência das infecções indica a presença de distúrbio de provável natureza imunológica ou infecciosa nesses pacientes. Dessa forma, no presente estudo, foram excluídos os pacientes com tonsilites recorrentes, de forma a obtermos uma amostra mais homogênea, dividida em dois grupos, entre os quais a principal diferença é a ocorrência de AR. Os estudos prévios utilizaram amostras de indivíduos sem alergias (Goldbart et al., 2004; 2005) ou não discriminaram tais alergias como fator de exclusão (Tsaoussoglou et al., 2012; 2014; Shen et al., 2012). O montelucaste é utilizado em terapia de doenças alérgicas, como asma e rinites e também tem efeito positivo no tratamento de SAOS leve secundária a HT, mesmo em indivíduos não alérgicos. Consideramos que comparação de grupos de sensibilizados e não sensibilizados quanto à expressão dos CysLTRs traria novos dados sobre a ação desses receptores na fisiopatologia da HT.

Por não haver dados prévios das possíveis diferenças entre os grupos, o tamanho da amostra foi estimado no princípio estatístico de distribuição normal (Callegari-Jacques, 2007), em caráter exploratório.

6.2 O Diagnóstico de SAOS

A pontuação média do PSQ foi acima do limítrofe para diagnóstico da SAOS em ambos os grupos (Tabela 1). Segundo Chervin et al. (2000), a sensibilidade e especificidade diagnóstica crescem proporcionalmente à pontuação no PSQ. No entanto, nesse trabalho os autores não especificam os valores de especificidade e sensibilidade para cada pontuação obtida.

O diagnóstico da SAOS baseado exclusivamente na pontuação do PSQ, sem a realização de polissonografia, pode ser considerado uma limitação do presente estudo. A utilização do PSQ como única ferramenta diagnóstica da SAOS é criticada por autores como Spruyt et al. (2011). Porém, os objetivos deste estudo foram avaliar o perfil celular das tonsilas hiperplásicas causadoras da SAOS, independentemente da gravidade do quadro. Também se deve considerar que a sensibilidade e a especificidade do PSQ justificam seu uso em estudos clínicos, como já feito anteriormente (Tsaoussoglou et al., 2012; Guillemineault et al., 2013). De acordo com Rosen et al. (2003; 2015), esse questionário tem uma sensibilidade e especificidade equivalentes às da polissonografia para diagnosticar SAOS em crianças e é mais abrangente devido a sua avaliação das diversas manifestações dos DRS.

A diferença na pontuação do PSQ, com maior gravidade entre os SE corrobora os resultados de estudos anteriores (Filiaci et al., 1997; McColley et al., 1997), que indicam as alergias respiratórias como fatores de risco para SAOS. Esses estudos não correlacionam, de maneira fisiopatológica, a AR com a HT, uma vez que se baseiam em características clínicas e esses autores

sugerem que a intensificação da SAOS ocorra devido à sobreposição dos dois distúrbios. Conforme o estudo de Kim et al. (2015), a AR é um fator relevante na patogênese da SAOS e pode impedir a resolução dos parâmetros clínicos noturnos mesmo após a realização de A2.

6.3 Os CysLTRs e a hiperplasia de TF

As células pequenas CD3+/CysLTR1+ totalizaram 11,1% \pm 5,5% sendo esse valor semelhante aos achados de Tsaoussoglou et al. (2012), em que essas células totalizaram 14% (2.8–22.1). Já as células CD3+/CysLTR2+ totalizaram 17,0% \pm 7,5% no presente estudo, enquanto o estudo prévio descreveu 36.4% (5.2–50.2). A amostra do estudo Tsaoussoglou et al. (2012) era composta por 10 indivíduos e apresentou grande variância, enquanto a presente amostra é composta por 30, sendo a variância menor. Dessa forma, acreditamos que a média obtida no presente estudo seja mais compatível com a média real desses indivíduos.

O mesmo estudo descreveu anatomicamente a expressão dos CysLTRs em células B nos centros germinativos e na zona do manto. Nesse artigo, 36,5% das células pequenas CD19+ eram CD19+/CysLTR1+ e dessas, 45,8% eram CD19+/CysLTR2+. Tais valores são próximos aos obtidos neste estudo (30,6% e 37,2% respectivamente). Esses linfócitos, de acordo com Mashid et al. (2009), apresentam também alta expressão da 5-LO, LTA4H e LTC4S intracelulares. Conforme já descrito anteriormente, um efeito importante da

ativação dos CysLTRs é o aumento das taxas de divisão celular (Panettieri et al., 1998; Ravasi et al., 2006; Spinozzi et al., 2004; Paruchuri et al., 2003; Matsuyama et al., 2007; 2008; Magnusson et al., 2010; 2011).

Já em relação às células grandes, os valores descritos por Tsaoussoglou et al. (2012) eram de 6,6% e 12,7% de CD19+/CysLTR1+ e CD19+/CysLTR2+, respectivamente. Essas médias conflitam com os presentes achados, nos quais as médias foram 44,6% e 55,3%, respectivamente. Tais diferenças podem ser explicadas pelo tamanho da amostra e pela possível presença de células dendríticas nesse grupo em nossa amostra.

O papel agonista dos CysLTRs na divisão celular de células neoplásicas foi demonstrado na série de artigos de Matsuyama et al. e Magnusson et al.; um papel semelhante foi descrito para células inflamatórias (Panettieri et al., 1998; Ravasi et al., 2006). Nos linfócitos tonsilares, tal ação foi mais elucidada por Dayyat et al. (2009), que mostraram uma redução na divisão celular em culturas contendo montelucaste e BAY u9773. Esse efeito foi também associado à indução de apoptose quando os linfócitos T ativados foram expostos a concentrações crescentes de montelucaste (Spinozzi et al. 2004). Dessa forma, considerando os dados coletados anteriormente e os encontrados neste estudo, sugerimos que, em tonsilas, a síntese de CysLTs e a ativação de CysLTR1 e 2 culminem na proliferação celular e consequente hiperplasia.

Já foi demonstrado que os CysLTs têm ação na quimiotaxia e migração de células Th2 e Th17 (Lee et al, 2015; Xue et al., 2015) e nossos achados não

permitem discriminar a proporção de linfócitos provenientes do sangue periférico.

Na periferia, a expressão do CysLTR1 em indivíduos normais ocorre em cerca de 4% dos linfócitos T (Figuroa et al., 2001), sendo esse valor semelhante ao encontrado em nosso estudo (1,3% em SE e 0,8% em NS). Em relação aos CysLTR2, o estudo de Heise et al. (2000) mostrou alta expressão em monócitos e em eosinófilos. Nossos dados também mostraram alta expressão desse receptor em células T e B. Não houve diferença na expressão dos CysLTRs em linfócitos periféricos de crianças SE e NS; esse dado sugere que as alergias respiratórias não estimulam significativamente a expressão de tais receptores na periferia.

Já nos tecidos tonsilares, as crianças sensibilizadas apresentaram expressões mais baixas de CysLTR1 e CysLTR2 do que as crianças não sensibilizadas e não houve diferença significativa no tamanho das TF e das TP entre os dois grupos. Considerando que crianças alérgicas apresentam maior concentração tissular de cisteinil-leucotrienos (Cifone et al., 1995; Figuroa et al., 2003), pode-se sugerir que os indivíduos sensibilizados necessitam menos expressão dos CysLTRs para obter o mesmo fenótipo que os indivíduos não sensibilizados. Essa proposição sugere uma tendência para uma associação negativa entre HT e AR e discorda da hipótese inicial dos autores.

Essa mesma diferença na expressividade não foi observada na contagem de RNAm através de RT-qPCR. Neste estudo, o RNAm foi extraído do total de células das TF, sem separação por subtipos e também não foi possível fazer a extração do material genético de todos os indivíduos, o que

restringiu o tamanho da amostra. Por tais motivos, a avaliação da expressão gênica foi limitada no presente trabalho. Deve-se considerar, contudo, que o objetivo principal dos autores foi quantificar a expressão proteica na superfície celular, uma vez que ela determina o seu comportamento.

Não houve correlação forte entre os principais achados clínicos e os perfis celulares, sugerindo que todas as subpopulações estudadas contribuem de forma semelhante com a para a patogênese da HT. Virtualmente, todas as linhas celulares de crianças SE e NS têm maior expressão de CysLTR2 do que CysLTR1, porém os achados não nos permitem determinar se um dos receptores tem maior atividade nesse fenômeno. Na prática clínica, dispomos de drogas capazes de bloquear apenas o CysLTR1. Estes medicamentos têm eficácia no tratamento da SAOS pediátrica leve, mesmo em indivíduos sem alergias respiratórias (Goldbart et al., 2004; 2005). BAY u9773 e BAY CysLT2 bloqueiam CysLTR2 e estão disponíveis exclusivamente para uso in vitro, e seu potencial para inibir a proliferação de células (Mashid et al., 2009; Figueroa et al., 2003) foi mostrado. Estes dados reforçam o potencial impacto positivo que novas drogas capazes de bloquear o CysLTR2 poderão ter no tratamento não cirúrgico da HT em crianças.

O desenho utilizado em nosso estudo (comparando crianças alérgicas e não alérgicas) não foi utilizado previamente, e o tamanho da amostra fornece uma representação populacional relevante. Além disso, a citometria de fluxo proporciona uma medição muito precisa dos perfis celulares.

6.4 Os CysLTRs e a maturação linfocitária

Nossos resultados complementam aqueles descritos no estudo de Tsaoussoglou et al. (2012), em que os linfócitos CD19+ de tonsilas foram classificados, de acordo com seu tamanho em citometria de fluxo, em pequenos (células maduras) e médios/ grandes (centrócitos e centroblastos). Tal estudo não descreveu a expressão de CD3+ em células grandes, em conflito com nossos achados, que apresentaram cerca de 30% de células CD3+ em tal subpopulação. No entanto, nossos dados estão de acordo com outros estudos anteriores (Hsuet al., 1985; Wipfler et al., 2011) que descreviam fração relevante da população de células T crescendo em tamanho durante a divisão e maturação.

As células progenitoras linfóides migram da medula óssea para órgãos linfóides secundários para diferenciar. Em linfonodos e tonsilas, os linfócitos T estão concentrados principalmente na área extrafolicular (Wipfler et al., 2011; Kjeldsen et al., 2011), onde, após o contato com o antígeno específico, começam a expansão clonal. A ativação e a divisão celular são mediadas por uma ampla variedade de citocinas e os cisteinil-leucotrienos são um importante mediador desse processo (Thivierge et al., 2009, Spanbroek et al., 2000; Dayyat et al., 2009). Nesse contexto, a expressão mais elevada de CysLTRs em células grandes pode sugerir um papel da via dos leucotrienos, não só em proliferação, mas também a maturação de linfócitos T em tonsilas. Além disso, a concentração basal de leucotrieno em tecido tonsilar hiperplásico é mantida

em níveis elevados, como mostrado por Shen et al (2012), indicando alta estimulação dos CysLTRs.

Em muitos aspectos, as vias de maturação seguidas por células B e T em tecidos linfoides secundários são análogas, dado que ambas têm necessidade de um contato antigênico específico para iniciar o processo. Depois de tal contato, as células B imaturas dão origem a centros germinativos oligoclonais, com alta atividade mitótica na zona escura e maturação progressiva na zona clara. Tais células (centroblastos e centrócitos) são tipicamente encontradas em citometria de fluxo na região de médias / grandes células (Kjeldsen et al., 2011). Estudos recentes têm demonstrado a expressão elevada de 5-LO, LTA4H e LTC4S em tecidos de tonsilas (Tsaoussoglou et al., 2014), especialmente na zona do manto. Mashid et al. (2009) descreveram baixa expressão da 5-LO em centros germinativos e alta na zona do manto. Isso pode explicar a maior expressão de CysLTRs em células de centros germinativos, uma vez que esta população de células tem o menor contato para cisteinil-leucotrienos produzido dentro do órgão. Mais estudos são necessários para elucidar o papel de CysLTRs em cada subtipo de células B e T, uma vez que cada subpopulação de células pode expressar esses receptores com padrões diferentes (Lynch et al., 1999).

Os dados publicados sobre a expressão de CysLTRs em SP medidos por citometria de fluxo são raros. Os estudos que inicialmente descreveram o CysLTR1 (Sarau et al., 1999) utilizaram Northern Blot e RT-qPCR para verificar a sua presença em linfócitos B e T periféricos. Em relação aos CysLTR2, os estudos focados na distribuição de tal receptor (Takasaki et al.,

2000; Heise et al., 2000) demonstraram sua expressão em linfócitos periféricos através de RT-qPCR. Desta forma, esses autores não descreveram com precisão o percentual de linfócitos B e T periféricos que expressam esses receptores. Outro estudo (Mita et al., 2001) descreveu expressão gênica relativa de CysLTR1 e CysLTR2 em linfócitos T periféricos, usando RT-qPCR, e observou maior expressão do primeiro. Este dado diverge dos encontrados em nosso estudo; essa comparação, no entanto, deve ser feita ponderando que a população estudada era de adultos sem DRS.

Assim, nossos dados trazem informações importantes sobre a expressão CysLTRs em SP, mostrando que a expressão CysLTR1 ocorre em cerca de 1% dos linfócitos T de SP, enquanto a expressão de CysLTR2 ocorre em cerca de 10%. Nos linfócitos B de SP, nossos resultados mostraram um alto percentual de células expressando ambos receptores, sendo essa expressão maior do que a observada na TF. Estes dados podem ser interpretados no contexto de produção de imunoglobulina. Crianças com HT têm níveis elevados de imunoglobulinas que tendem a diminuir após a adenotonsilectomia (van den Akker, 2006). Alguns estudos também têm demonstrado níveis mais elevados de IgE nesta população, (Sadeghi-Shabestari et al., 2011). No entanto, a proporção de células que secretam imunoglobulina em tecido tonsilar é baixo (Nadalet al., 1992) (2-3%), enquanto as células da superfície da mucosa são o principal produtor de imunoglobulinas. Esses dados sugerem que os linfócitos B de SP devam também atuar na produção de imunoglobulina nesta população.

Na população pediátrica de São Paulo, a prevalência de alergias respiratórias varia entre 26-48% (Sousa et al., 2008; Nicolussi et al., 2014) e os indivíduos alérgicos têm maior concentração sanguínea de CysLTs do que indivíduos não alérgicos (Peters-Golden et al., 2006; Mewes et al., 1996). Quando os pacientes foram categorizados de acordo com a sensibilização a alérgenos respiratórios, a expressão de CysLTRs foi similar em ambos os grupos, mostrando que o estímulo alérgico não parece influenciar o fenótipo. Além disso, a alta expressão de CysLTRs em indivíduos não-sensibilizados de nossa amostra está de acordo com achados anteriores, que sugerem papel inflamatório dos leucotrienos, mesmo em respostas não-Th2.

Dessa forma, nossos dados nos permitem afirmar que a via dos leucotrienos possivelmente exerce um papel na proliferação, maturação e ativação de linfócitos, em crianças com HT. Novos estudos comparando tonsilas normais são necessários para melhor elucidar o papel desta via na maturação celular; drogas capazes de bloquear ambos receptores provavelmente exercerão um efeito positivo no tratamento não cirúrgico da HT.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que as expressões de CysLTR1 e CysLTR2 são mais elevadas nos linfócitos de tonsilas hiperplásicas de crianças não-sensibilizadas em relação às sensibilizadas aos alérgenos respiratórios, sugerindo que as alergias respiratórias não aparentam ser um fator causal na gênese da HT. Há maior expressão de CysLTR2 em relação ao CysLTR1 nas células estudadas.

As células CD3+ têm maior expressão de CysLTR1 e CysLTR2 nos estágios de menor diferenciação celular, enquanto as células CD19+ têm maior expressão dos CysLTRs nos estágios de maior maturidade celular, o que sugere um papel para tais receptores no processo de divisão, maturação e diferenciação celular.

8 ANEXOS

Anexo A: Carta de aprovação da Cappesq- projeto original

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES 1 E 2 DE LEUCOTRIENOS NA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS B E T EM TONSILAS HIPERPLÁSICAS DE CRIANÇAS: COMPARAÇÃO ENTRE ALÉRGICOS E NÃO ALÉRGICOS

Pesquisador Responsável: Renata Cantisani di Francesco

Versão: 3

Pesquisador Executante: Bruno Peres Paulucci

CAAE: 13737413.9.0000.0068

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Orientador: Renata Cantisani di Francesco

Instituição: HCFMUSP

Departamento: OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10492

Número do Parecer: 675.064

Data da Relatoria: 04/06/14

Apresentação do Projeto: Não houve alteração do projeto. A pesquisadora solicita visibilidade do parecer 569.182 emitido pelo CEP em 26/03/2014. Nessa data o CEP HCFMUSP aprovou a inclusão do Hospital Universitário da USP como coparticipante do projeto de pesquisa acima referenciado.

Objetivo da Pesquisa: Não alterado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não alterado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Não alterado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Nada a declarar.

Recomendações: A Plataforma Brasil (PB) ainda apresenta alguns problemas operacionais, assim deve-se procurar as autoridades do Sistema PB.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: A emenda está aprovada.


Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

São Paulo, 04 de Junho de 2014

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo B: Carta de aprovação da Cappelq- emenda



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E DA DISTRIBUIÇÃO ANATÔMICA DOS RECEPTORES 1 E 2 DE LEUCOTRIENOS NA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS B E T TONSILARES EM CRIANÇAS COM AUMENTO DAS TONSILAS: COMPARAÇÃO ENTRE ALÉRGICOS E NÃO ALÉRGICOS

Pesquisador Responsável: Renata Cantisani di Francesco **Versão:** 1
Pesquisador Executante: Bruno Peres Paulucci **CAAE:** 40593015.8.0000.0068

Finalidade Acadêmica: Doutorado
Orientador: Renata Cantisani di Francesco
Instituição: HCFMUSP
Departamento: OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 12988
Número do Parecer: 951.677
Data da Relatoria: 11/02/2015

Apresentação do Projeto: O estudo é uma comparação de expressão gênica entre indivíduos com diferentes perfis de reações alérgicas.

Objetivo da Pesquisa: Comparar indivíduos com diferentes respostas alérgicas respiratórias quanto à expressão dos subtipos dos receptores CysLT1R.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos são baixos, limitando-se aos incômodos dos testes de alergia. Não há benefícios diretos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Embora a pesquisa seja um estudo genético, sua natureza observacional dispensa apreciação pela CONEP o projeto tem condições de execução e de atingir seus objetivos científicos.

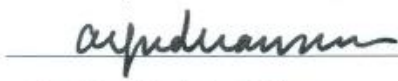
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O TCLE é suficientemente claro, apesar de estar subdividido em vários textos numerados. As prerrogativas dos participantes estão claras e não se esperam problemas na aplicação do documento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O projeto tem todas as condições para ser aprovado pela comissão.

Situação do Parecer: Aprovado
Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 11 de fevereiro de 2015



Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C: Aprovações na Plataforma Brasil- Projeto original e emenda

Saúde
Ministério da Saúde

Plataforma Brasil

Público Pesquisador Alterar Meus Dados Bruno 1

Cadastrados

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão gênica e da distribuição anatômica dos receptores 1 e 2 de leucotrienos na população de linfócitos B e T tonsilares em crianças com aumento das tonsilas: comparação entre alérgicos e não alérgicos
Pesquisador Responsável: Renata Cantisani Di Francesco
Área Temática: Genética Humana
 (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.)

Versão: 1
 CAAE: 40593015.8.0000.0068
 Submetido em: 13/01/2015
 Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P
 Situação da Versão do Projeto: Aprovado
 Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
 Patrocinador Principal: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P
 FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

COORDENADOR

Plataforma Brasil

Público Pesquisador Alterar Meus Dados Bruno Peres

Cadastrados

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão dos receptores 1 e 2 de leucotrienos na população de linfócitos B e T tonsilares em crianças aumento das tonsilas: comparação entre alérgicos e não alérgicos
Pesquisador Responsável: Renata Cantisani Di Francesco
Área Temática:
 Versão: 3
 CAAE: 13737413.9.0000.0068
 Submetido em: 24/05/2014
 Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P
 Situação da Versão do Projeto: Aprovado
 Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
 Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO
 HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

COORDENADOR

Comprovante de Recepção: PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_340437

Anexo D

Protocolo de extração de RNA total de células em suspensão (RNeasy Mini Kit da Qiagen®)

- 1- Adição de 700 µl de solução de RNA-later com β-mercaptoetanol a 1%
- 2- Homogeneização do sedimento
- 3- Congelamento a -80°C para armazenamento
- 4- Descongelamento das amostras em temperatura ambiente
- 5- Homogeneização em vórtex durante 1 min, seguida de homogeneização em seringa
- 6- Centrifugação em velocidade máxima por 3 min e transferência do supernadante para novo tubo

- 7- Adição de 700 µl de etanol 70% e homogeneização
- 8- Transferência de 700 µl da solução para coluna RNeasy spin® e centrifugação por 15s
- 9- Descarte do resíduo
- 10- Adição de 700 µl de tampão RW1® em coluna, centrifugado por 15s, descarte de resíduo
- 11- Adição de 500 µl de tampão RPE® em coluna, centrifugado por 15s, descarte de resíduo
- 12- Adição de 500 µl de tampão RPE® em coluna, centrifugado por 120s, descarte de resíduo
- 13- Alocação da coluna RNeasy spin® em novo tubo coletor, adição de 30µl de água livre de RNase e centrifugação por 60s para eluição do RNA de membrana

Anexo E

Protocolo do kit Superscript III da Invitrogen® para transcrição de RNA em cDNA

- 1- Adição de 1µl de Oligo(dT)20®
- 2- Adição de 1µl de dNTP mix®
- 3- Incubação a 65°C por 5 min
- 4- Incubação em gelo por 1 min
- 5- Adição de 2µl de tampão 10X RT®
- 6- Adição de 4µl de MgCl₂ a 25 mM
- 7- Adição de 2µl de DTT® a 0.1M
- 8- Adição de 1µl de RNaseOUT® (40 U/µl)
- 9- Adição de 1µl de SuperScript III RT® (200 U/µl)
- 10- Homogeneização delicada e centrifugação por 15 s
- 11- Incubação a: 50 °C (50min), 85°C (5min) e manutenção a 0°C
- 12- Adição de 1µl de RNaseH®
- 13- Incubação a: 37°C (20min)
- 14- Armazenamento a -20°C

Anexo F

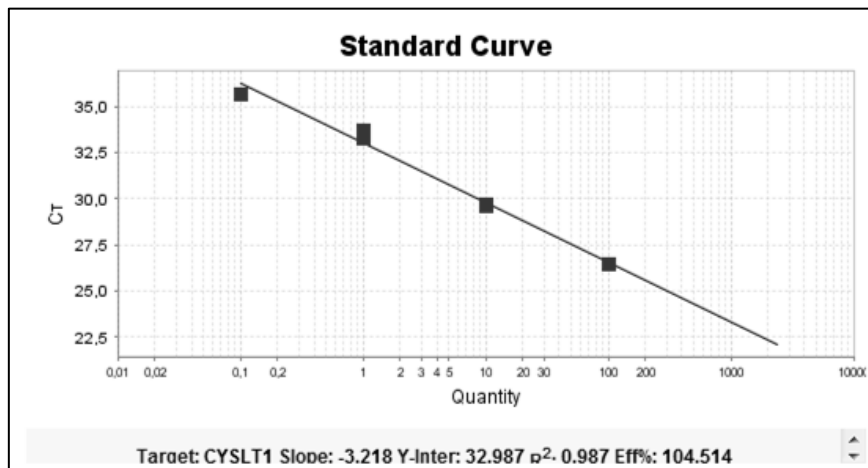
Protocolo do kit SYBR® Green PCR Master Mix- Invitrogen® para amplificação de cDNA

- 1- Adição de 25µl de tampão PCR Master Mix®
- 2- Adição de 5 µM de *Forward Primer*
- 3- Adição de 5 µM de *Reverse Primer*
- 4- Adição de 5 µl de template

- 5- Adição de água deionizada para completar 50 μ l
- 6- Ciclagem

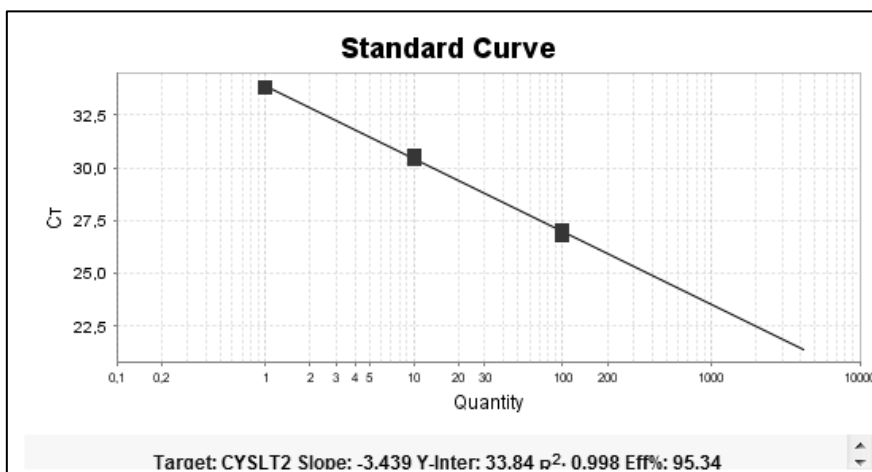
Anexo G

Curva logarítmica padrão dos Ct para detecção de CysLTR1 em RT-qPCR



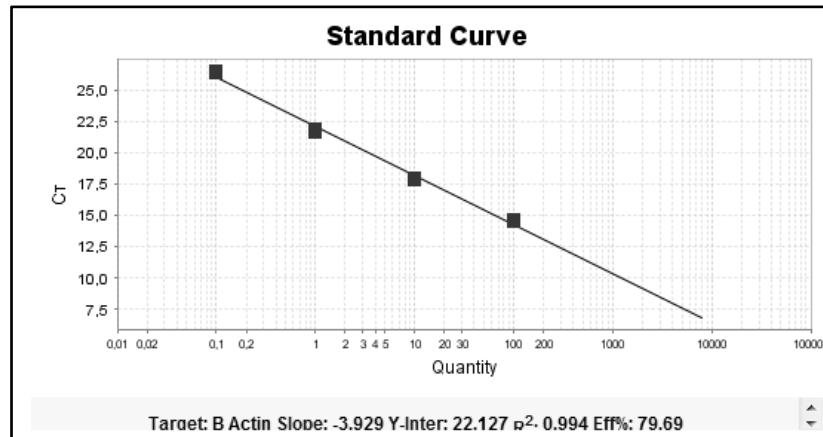
Anexo H

Curva logarítmica padrão dos Ct para detecção de CysLTR2 em RT-qPCR



Anexo I

Curva logarítmica padrão dos Ct para detecção de β -actina em RT-qPCR



9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

Ameli F, Brocchetti F, Tosca MA. Tonsil volume and allergic rhinitis in children. *Allergy Rhinol.* 2014; 3:137-142.

Arens R, Sin S, McDonough JM, Palmer JM, Dominguez T, Meyer H, Pack AI: Changes in upper airway size during tidal breathing in children with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Jun 1; 171(11):1298-304.

Arens R. Is it time to consider a new treatment for children with sleep-disordered breathing? *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Aug 1;172(3):264-5.

Bäck M, Hansson GK. Leukotriene receptors in atherosclerosis. *Ann Med.* 2006;38(7):493-502.

Bao G, Guilleminault C. Upper airway resistance syndrome-one decade later. *Curr Opin Pulm Med.* 2004 Nov;10(6):461-7.

Barlow SE and the Expert Committee. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *Pediatrics.* 2007;120 Supplement December 2007:S164—S192.

Bhattacharjee R, Khan AM. Adenotonsillectomy Outcomes in treatment of Obstructive Sleep Apnea in Children: A Multicenter Retrospective Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Mar 15;183(6):826.

Bonuck KA, Freeman K, Henderson J. Growth and growth biomarker changes after adenotonsillectomy: systematic review and meta-analysis. *Arch. Dis. Child.* 2009;94:83-91.

Bossé Y, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Cysteinyl-leukotrienes in asthmatic airway smooth muscle cell hyperplasia. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2009 Jan;102(1):16-21.

Brodsky L, Adler E, Stanievich JF. Naso- and oropharyngeal dimensions in children with obstructive sleep apnea. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1989 Feb;17(1):1-11.

Callegari-Jacques, SM. Bioestatística: Princípios e aplicações- Porto Alegre: Artmed, 2007.

Capra V, Thompson MD, Sala A, Cole DE, Folco G, Rovati GE: Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. *Med Res Rev.* 2007 Jul;27(4):469-527.

Carter KA, Hathaway NE, Lettieri CF. Common sleep disorders in children. *Am Fam Physician*. 2014 Mar 1; 89(5):368-77.

Caylakli F, Hizal E, Yilmaz I, Yilmazer C. Correlation between adenoid-nasopharynx ratio and endoscopic examination of adenoid- hypertrophy: a blind, prospective clinical study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2009 Nov;73(11):1532-5.

Certal V, de Lima FF, Winck JC, Azevedo I, Costa-Pereira A. Translation and cross-cultural adaptation of the Pediatric Sleep Questionnaire into Portuguese language. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015;79:175-178.

Chervin RD, Hedger K, Dillon JE, Pituch KJ. Pediatric sleep questionnaire (PSQ): validity and reliability of scales for sleep-disordered breathing, snoring, sleepiness, and behavioral problems. *Sleep Med*. 2000 Feb 1;1(1):21-32.

Cifone MG, Cironi L, Santoni A, Testi R. Diacylglycerol lipase activation and 5-lipoxygenase activation and translocation following TCR/CD3 triggering in T cells. *Eur J Immunol*. 1995;25:1080-1086.

Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000; 320: 1240 – 1243.

Corrigan C, Mallett K, Ying S, Roberts D, Parikh A, Scadding G, Lee T. Expression of the cysteinyl leukotriene receptors cysLT(1) and cysLT(2) in aspirin-sensitive and aspirin-tolerant chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(2):316–322.

Criscuoli G, D'Amora S, Ripa G, Cinquegrana G, Mansi N, Impagliazzo N, Pisacane A. Frequency of surgery among children who have adenotonsillar hypertrophy and improve after treatment with nasal beclomethasone. *Pediatrics*. 2003 Mar;111(3):e236-8.

Dannull J, Schneider T, Lee WT, de Rosa N, Tyler DS, Pruitt SK. Leukotriene C4 induces migration of human monocyte-derived dendritic cells without loss of immunostimulatory function. *Blood*. 2012 Mar 29;119(13):3113-22.

Dayyat E, Serpero LD, Kheirandish-Gozal L, Goldman JL, Snow A, Bhattacharjee R, Gozal D. Leukotriene pathways and in vitro adenotonsillar cell proliferation in children with obstructive sleep apnea. *Chest*. 2009 May;135(5):1142-9.

Dell'Aringa AR, Juares AJ, Melo Cd, Nardi JC, Kobari K, Perches Filho RM. Histological analysis of tonsillectomy and adenoidectomy specimens--January 2001 to May 2003. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2005 Jan-Feb;71(1):18-22.

Denzlinger C, Kanz L, Möhle R, Bautz F. Chemotaxis and transendothelial migration of CD34(+) hematopoietic progenitor cells induced by the inflammatory mediator leukotriene D4 are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT1. *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3433-40.

Dillon JE, Blunden S, Ruzicka DL, Guire KE, Champine D, Weatherly RA, Hodges EK, Giordani BJ, Chervin RD. DSM-IV diagnoses and obstructive sleep apnea in children before and 1 year after adenotonsillectomy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2007 Nov;46(11):1425-36.

Eren E, Arslanoğlu S, Erdem SB. Chicken or the egg: the dilemma of allergic rhinitis versus adenoid hypertrophy. *Rhinology*. 2015; 53:154-159.

Espinosa K, Bosse Y, Stankova J. CysLT1 receptor upregulation by TGF-beta and IL-3 is associated with bronchial smooth muscle cell proliferation in response to LTD4. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 May;111(5):1032-40.

Evcimik MF, Dogru M, Cirik AA, Nepesov MI. Adenoid hypertrophy in children with allergic disease and influential factors. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015; 79:694-697.

Figuroa DJ, Breyer R, Defoe S, Kargman S, Daugherty BL, Waldburger K, Clements MK, Lui Q, Zeng Z, Jones TR. Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:226-233.

Figuroa DJ, Borish L, Baramki D, Philip G, Austin CP, Evans JF. Expression of cysteinyl leukotriene synthetic and signalling proteins in inflammatory cells in active seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(10):1380-1388.

Filiaci F, Zambetti G, Lovecchio A, Romeo R. Nasal hypersensitivity and recurrent adenoids disease. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1997 Jul-Aug;25(4):199-202.

Georgalas C, Thomas K, Owens C, Abramovich S, Lack G. Medical treatment for rhinosinusitis associated with adenoidal hypertrophy in children: an evaluation of clinical response and changes on magnetic resonance imaging. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005 Aug;114(8):638-44.

Goldbart AD, Goldman JL, Li RC, Brittan KR, Tauman R, Gozal D. Differential expression of cysteinyl leukotriene receptors 1 and 2 in tonsils of children with obstructive sleep apnea syndrome or recurrent infection. *Chest*. 2004 Jul;126(1):13-8.

Goldbart AD, Goldman JL, Veling MC, Gozal D. Leukotriene modifier therapy for mild sleep-disordered breathing in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:364-370.

Goldbart AD, Krishna J, Li RC, Serpero LD, Gozal D. Inflammatory mediators in exhaled breath condensate of children with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*. 2006;130:143–148.

Goldbart AD, Mager E, Veling MC, Goldman JL, Kheirandish-Gozal L, Serpero LD, Piedimonte G, Gozal D. Neurotrophins and tonsillar hypertrophy in children with obstructive sleep apnea. *Pediatr Res*. 2007 Oct;62(4):489-94.

Goldbart AD, Greenberg-Dotan S, Tal A. Montelukast for children with obstructive sleep apnea: a double-blind, placebo-controlled study. *Pediatrics*. 2012 Sep;130(3):e575-80.

Gozal D, Kheirandish-Gozal L, Serpero LD, Sans Capdevila O, Dayyat E. Obstructive sleep apnea and endothelial function in school-aged nonobese children: effect of adenotonsillectomy. *Circulation*. 2007 Nov 13;116(20):2307-14.

Gozal D, Serpero LD, Sans Capdevila O, Kheirandish-Gozal L. Systemic inflammation in non-obese children with obstructive sleep apnea. *Sleep Med*. 2008 Mar;9(3):254-9.

Gozal D, Capdevila OS, Kheirandish-Gozal L. Metabolic alterations and systemic inflammation in obstructive sleep apnea among non-obese and obese prepubertal children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(10):1142–1149.

Gozal D, Kheirandish-Gozal L. New approaches to the diagnosis of sleep-disordered breathing in children. *Sleep Med*. 2010 Aug;11(7):708-13.

Gozal D, Kheirandish-Gozal L, Bhattacharjee R, Kim J. C-reactive protein and obstructive sleep apnea syndrome in children. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 Jun 1;4:2410-22.

Guilleminault C, Huang YS, Quo S, Monteyrol PJ, Lin CH. Teenage sleep-disordered breathing: recurrence of syndrome. *Sleep Med*. 2013 Jan;14(1):37-44.

Halbower AC, Ishman SL, McGinley BM. Childhood obstructive sleep-disordered breathing: a clinical update and discussion of technological innovations and challenges. *Chest*. 2007 Dec;132(6):2030-41.

Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im D-S, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL Jr, Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR, Evans JF. Characterization of the Human Cysteinyl Leukotriene 2 Receptor. *J Biol Chem*. 2000; 275(39):30531–30536.

Henderson WR Jr, Tang LO, Chu SJ, Tsao SM, Chiang GK, Jones F, Jonas M, Pae C, Wang H, Chi EY. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jan 1;165(1):108-16.

Hoefakker S, van 't Erve EH, Deen C, van den Eertwegh AJ, Boersma WJ, Notten WR, Claassen E. Immunohistochemical detection of co-localizing cytokine and antibody producing cells in the extrafollicular area of human palatine tonsils. *Clin Exp Immunol*. 1993 Aug;93(2):223-8.

Hsu SM, Jaffe ES. Phenotypic expression of T lymphocytes in thymus and peripheral lymphoid tissues. *Am J Pathol*. 1985 Oct;121(1):69-78.

Hsu CH, Hu CM, Lu KH, Yang SF, Tsai CH, Ko CL, Sun HL, Lue KH. Effect of selective cysteinyl leukotriene receptor antagonists on airway inflammation and matrix metalloproteinase expression in a mouse asthma model. *Pediatr Neonatol*. 2012 Aug;53(4):235-44.

Huang SW, Giannoni C. The risk of adenoid hypertrophy in children with allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001; 87:350-355.

Hwang SH, Guilleminault C, Park CS, Kim TW, Hong SC. Usefulness of adenotonsillar size for prediction of severity of obstructive sleep apnea and flow limitation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013 Aug;149(2):326-34.

Ievers-Landis CE, Redline S. Pediatric sleep apnea: implications of the epidemic of childhood overweight. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Mar 1;175(5): 436-41.

Jiang Y, Kanaoka Y, Feng C, Nocka K, Rao S, Boyce JA. Cutting edge: Interleukin 4-dependent mast cell proliferation requires autocrine/intracrine cysteinyl leukotriene- induced signaling. *J Immunol*. 2006 Sep 1;177(5):2755-9.

Kaditis AG, Ioannou MG, Chaidas K, Alexopoulos EI, Apostolidou M, Apostolidis T, Koukoulis G, Gourgoulianis K. Cysteinyl leukotriene receptors are expressed by tonsillar T cells of children with obstructive sleep apnea. *Chest*. 2008 Aug;134(2):324-31.

Kaditis AG, Alexopoulos E, Chaidas K. Urine concentrations of cysteinyl leukotrienes in children with obstructive sleep-disordered breathing. *Chest* 2009;135:1496–1501.

Karlson KH. What's New in Pediatric Obstructive Sleep Apnea? *Clin Pulm Med* 2008;15: 226–231.

Kheirandish L, Goldbart AD, Gozal D. Intranasal steroids and oral leukotriene modifier therapy in residual sleep-disordered breathing after tonsillectomy and adenoidectomy in children. *Pediatrics*. 2006 Jan;117(1):61-6.

Kim DK, Han DH. Impact of allergic rhinitis on quality of life after adenotonsillectomy for pediatric sleep-disordered breathing. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015 Aug;5(8):741-6.

Kjeldsen MK, Perez-Andres M, Schmitz A, Johansen P, Boegsted M, Nyegaard M, Gaihede M, Bukh A, Johnsen HE, Orfao A, Dybkaer K. Multiparametric flow cytometry for identification and fluorescence activated cell sorting of five distinct B-cell subpopulations in normal tonsil tissue. *Am J Clin Pathol*. 2011 Dec;136(6):960-9.

Kramer MF, Mack B, Rasp G. Immunohistological expression of interleukin 16 in human tonsils. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001 Sep;127(9):1120-5.

Kuhle S, Urschitz MS. Anti-inflammatory medications for obstructive sleep apnea in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Jan 19;(1):CD007074.

Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DM, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, van Breda Vriesman PJ, Sminia T. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today*. 1992 Jun;13(6):219-24.

Lamoureux J, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Leukotriene D4 enhances immunoglobulin production in CD40-activated human B lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Apr;117(4):924-30.

Lee W, Su Kim H, Lee GR. Leukotrienes induce the migration of Th17 cells. *Immunol Cell Biol*. 2015 May-Jun;93(5):472-9.

Leitzen KP, Brietzke SE, Lindsay RW. Correlation between nasal anatomy and objective obstructive sleep apnea severity. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014 Feb;150(2):325-31.

Lertsburapa K, Schroeder JW Jr. Assessment of adenoid size: comparison of lateral radiographic measurements, radiologist assessment and nasal endoscopy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2010 Nov;74(11):1281-5.

Lynch KR, Gary P, O'Neill GP, Qingyun Liu Q, Im D-S, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateaufneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL Jr, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature*. 1999;399:789-793.

Magnusson C, Mezhybovska M, Lörinç E, Fernebro E, Nilbert M, Sjölander A. Low expression of CysLT1R and high expression of CysLT2R mediate good prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2010 Mar;46(4):826-35.

Magnusson C, Liu J, Ehrnström R, Manjer J, Jirström K, Andersson T, Sjölander A. Cysteinyl leukotriene receptor expression pattern affects migration of breast cancer cells and survival of breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2011 Jul 1;129(1):9-22.

Marcus CL, Brooks LJ, Draper KA, Gozal D, Halbower AC, Jones J, Schechter MS, Sheldon SH, Spruyt K, Ward SD, Lehmann C, Shiffman RN. American Academy of Pediatrics. Diagnosis and management of childhood obstructive sleep apnea syndrome. *Pediatrics*. 2012 Sep;130(3):576-84.

Marshall T: A review of tonsillectomy for recurrent throat infection. *Br J Gen Pract*. 1998 Jun;48(431):1331-5.

Mashid Y, Lisy MR, Wang X, Spanbroek R, Flygare J, Christensson B, Björkholm M, Sander B, Habenicht AJ, Claesson HE. High expression of 5-lipoxygenase in normal and malignant mantle zone B lymphocytes. *BMC Immunol*. 2009 Jan 9;10:2.

Matsuyama M, Hayama T, Funao K, Kawahito Y, Sano H, Takemoto Y, Nakatani T, Yoshimura R. Overexpression of cysteinyl LT1 receptor in prostate cancer and CysLT1R antagonist inhibits prostate cancer cell growth through apoptosis. *Oncol Rep*. 2007 Jul;18(1):99-104.

Matsuyama M, Funao K, Hayama T, Tanaka T, Kawahito Y, Sano H, Takemoto Y, Nakatani T, Yoshimura R. Relationship between cysteinyl-leukotriene-1 receptor and human transitional cell carcinoma in bladder. *Urology*. 2009 Apr;73(4): 916-21.

Matsuyama M, Funao K, Kawahito Y, Sano H, Chargui J, Touraine JL, Nakatani T, Yoshimura R. Expression of cysteinyl LT1 receptor in human testicular cancer and growth reduction by its antagonist through apoptosis. *Mol Med Report*. 2009 Mar-Apr;2(2):163-7.

Matsuyama M, Yoshimura R. Cysteinyl-leukotriene1 receptor is a potent target for the prevention and treatment of human urological cancer. *Mol Med Report*. 2010 Mar-Apr;3(2):245-51.

McColley SA, Carroll JL, Curtis S. High prevalence of allergic sensitization in children with habitual snoring and obstructive sleep apnea. *Chest*. 1997 Jan;111(1):170-3.

McMahon B, Stenson C, McPhillips F, Fanning A, Brady HR, Godson C. Lipoxin A4 antagonizes the mitogenic effects of leukotriene D4 in human renal

mesangial cells. Differential activation of MAP kinases through distinct receptors. *J Biol Chem*. 2000 Sep 8;275(36):27566-75.

McMahon B, Mitchell D, Shattock R, Martin F, Brady HR, Godson C. Lipoxin, leukotriene, and PDGF receptors cross-talk to regulate mesangial cell proliferation. *FASEB J*. 2002 Nov;16(13):1817-9.

Mellor EA, Frank N, Soler D, Hodge MR, Lora JM, Austen KF, Boyce JA. Expression of the type 2 receptor for cysteinyl leukotrienes (CysLT2R) by human mast cells: Functional distinction from CysLT1R. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(20):11589–11593.

Mewes T, Riechelmann H, Klimek L. Increased in vitro cysteinyl leukotriene release from blood leukocytes in patients with asthma, nasal polyps, and aspirin intolerance. *Allergy*. 1996 Jul;51(7):506-10.

Mita H, Hasegawa M, Saito H, Akiyama K. Levels of cysteinyl leukotriene receptor mRNA in human peripheral leucocytes: Significantly higher expression of cysteinyl leukotriene receptor 2 mRNA in eosinophils. *Clin Exp Allergy* 2001;31(11):1714–1723.

Mitchell RB. Adenotonsillectomy for obstructive sleep apnea in children: outcome evaluated by pre- and postoperative polysomnography. *Laryngoscope*. 2007 Oct;117(10):1844-54.

Modrzynski M, Zawisza E. An analysis of the incidence of adenoid hypertrophy in allergic children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007 May;71(5):713-9.

Mowry SE, Strocker AM, Chan J, Takehana C, Kalantar N, Bhuta S, Shapiro NL. Immunohistochemical analysis and Epstein-Barr virus in the tonsils of transplant recipients and healthy controls. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008 Sep;134(9):936-9.

Musiatowicz M, Wysocka J, Kasprzyca E, Hassmann E. Lymphocyte subpopulations in hypertrophied adenoid in children. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 59 (2001) 7-13.

Nadal D, Soh N, Schläpfer E, Bernstein JM, Ogra PL. Distribution characteristics of immunoglobulin-secreting cells in adenoids. Relationship to age and disease. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1992 Sep;24(2):121-30.

Nathan RA. The pathophysiology, clinical impact, and management of nasal congestion in allergic rhinitis. *Clin Ther*. 2008 Apr;30(4):573-86.

Ng DK, Chan CH, Hwang GY, Chow PY, Kwok KL. A review of the roles of allergic rhinitis in childhood obstructive sleep apnea syndrome. *Allergy Asthma Proc*. 2006 May-Jun;27(3):240-2.

Nicolussi FH, Santos AP, André SC, Veiga TB, Takayanagui AM. Air pollution and respiratory allergic diseases in schoolchildren. *Rev Saude Publica*. 2014 Apr;48(2):326-30.

Nolan J, Brietzke SE. Systematic review of pediatric tonsil size and polysomnogram-measured obstructive sleep apnea severity. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011 Jun;144(6):844-50.

Noussios G, Xanthopoulos J, Zaraboukas T, Vital V, Konstantinidis I. Morphological study of development and functional activity of palatine tonsils in embryonic age. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2003 Apr;23(2):98-101.

O'Brien LM, Serpero LD, Tauman R, Gozal D. Plasma adhesion molecules in children with sleep-disordered breathing. *Chest*. 2006 Apr;129(4):947-53.

Ohd JF, Nielsen CK, Campbell J, Landberg G, Löfberg H, Sjölander A. Expression of the leukotriene D4 receptor CysLT1, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology*. 2003; 124: 57-70.

Panettieri RA, Tan EM, Ciocca V, Luttmann MA, Leonard TB, Hay DW. Effects of LTD4 on human airway smooth muscle cell proliferation, matrix expression, and contraction In vitro: differential sensitivity to cysteinyl leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 Sep;19(3):453-61.

Parmentier CN, Fuerst E, McDonald J, Bowen H, Lee TH, Pease JE, Woszczek G, Cousins DJ. Human T(H)2 cells respond to cysteinyl leukotrienes through selective expression of cysteinyl leukotriene receptor 1. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Apr;129(4):1136-42.

Paruchuri S. Leukotriene D4 mediates survival and proliferation via separate but parallel pathways in the human intestinal epithelial cell line Int 407. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14;278(46):45577-85.

Peters-Golden M, Gleason MM, Togias A. Cysteinyl leukotrienes: multi-functional mediators in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2006 Jun;36(6):689-703.

Porreca E, Di Febbo C, Di Sciullo A, Angelucci D, Nasuti M, Vitullo P, Reale M, Conti P, Cuccurullo F, Poggi A. Cysteinyl leukotriene D4 induced vascular smooth muscle cell proliferation: a possible role in myointimal hyperplasia. *Thromb Haemost*. 1996 Jul;76(1):99-104.

Praud JP, Dorion D. Obstructive sleep disordered breathing in children: beyond adenotonsillectomy. *Pediatr Pulmonol*. 2008 Sep;43(9):837-43.

Rademakers LH. Dark and light zones of germinal centres of the human tonsil: an ultrastructural study with emphasis on heterogeneity of follicular dendritic cells. *Cell Tissue Res.* 1992 Aug;269(2):359-68.

Ravasi S, Citro S, Viviani B, Capra V, Rovati GE. CysLT1 receptor-induced human airway smooth muscle cells proliferation requires ROS generation, EGF receptor transactivation and ERK1/2 phosphorylation. *Respir Res.* 2006 Mar 22;7:42.

Ray RM, Bower CM. Pediatric obstructive sleep apnea: the year in review. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery.* 2005, 13:360-365.

Riccioni G, Zanasi A, Vitulano N, Mancini B, D'Orazio N. Leukotrienes in atherosclerosis: new target insights and future therapy perspectives. *Mediators Inflamm.* 2009:737282.

Rosen CL, Larkin EK, Kirchner HL, Emancipator JL, Bivins SF, Surovec SA, Martin RJ, Redline S. Prevalence and risk factors for sleep disordered breathing in 8- to 11-year-old children: association with race and prematurity. *J Pediatr.* 2003;142:383–389.

Rosen CL, Wang R, Taylor HG, Marcus CL, Katz ES, Paruthi S, Arens R, Muzumdar H, Garetz SL, Mitchell RB, Jones D, Weng J, Ellenberg S, Redline S, Chervin RD. Utility of symptoms to predict treatment outcomes in obstructive sleep apnea syndrome. *Pediatrics.* 2015 Mar; 135(3):e662-71.

Sadeghi-Shabestari M, Jabbari Moghaddam Y, Ghaharri H. Is there any correlation between allergy and adenotonsillar tissue hypertrophy? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011 Apr;75(4):589-91.

Sarau HM, Ames RS, Chambers J, Ellis C, Elshourbagy N, Foley JJ, Schmidt DB, Muccitelli RM, Jenkins O, Murdock PR, Herrity NC, Halsey W, Sathe G, Muir AI, Nuthulaganti P, Dytko GM, Buckley PT, Wilson S, Bergsma DJ, Hay DW. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharm.* 1999;56(3):657–663.

Scadding GW, Scadding GK: Recent advances in antileukotriene therapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010 Aug;10(4):370-6.

Shen Y, Xu Z, Huang Z, Xu J, Qin Q, Shen K. Increased cysteinyl leukotriene concentration and receptor expression in tonsillar tissues of Chinese children with sleep-disordered breathing. *Int Immunopharmacol.* 2012 Aug;13(4):371-6.

Shen Y, Qin Q, Xu Z, Shen K. Serum leukotrienes, circulating neutrophils, and high sensitivity C-reactive protein in Chinese children with sleep-disordered breathing. *Int Immunopharmacol.* 2014 Sep;22(1):120-5.

Shirasaki H, Kanaizumi E, Watanabe K, Matsui T, Sato J, Narita S, Rautiainen M, Himi T. Expression and localization of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in human nasal mucosa. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(7):1007–1012.

Soumaoro LT, Iida S, Uetake H, Ishiguro M, Takagi Y, Higuchi T, Yasuno M, Enomoto M, Sugihara K. Expression of 5-lipoxygenase in human colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2006; 12: 6355-6360.

Sousa CA, César CL, Barros MB, Carandina L, Goldbaum M, Pereira JC. Respiratory diseases and associated factors: population-based study in São Paulo, 2008-2009. *Rev Saude Publica*. 2012 Feb;46(1):16-25.

Spanbroek R, Hildner M, Steinhilber D, Fusenig N, Yoneda K, Rådmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. 5-lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34(+) hematopoietic progenitors and in lymphoid organs. *Blood*. 2000 Dec 1;96(12):3857-65.

Spinozzi F, Russano AM, Piattoni S, Agea E, Bistoni O, de Benedictis D, de Benedictis FM. Biological effects of montelukast, a cysteinyl-leukotriene receptor-antagonist, on T lymphocytes. *Clin Exp Allergy*. 2004 Dec;34(12):1876-82.

Spruyt K, Gozal D. Pediatric sleep questionnaires as diagnostic or epidemiological tools: a review of currently available instruments. *Sleep Med Rev*. 2011 Feb;15(1):19-32.

Sveinbjörnsson B, Rasmuson A, Baryawno N, Wan M, Pettersen I, Ponthan F, Orrego A, Haeggström JZ, Johnsen JI, Kogner P. Expression of enzymes and receptors of the leukotriene pathway in human neuroblastoma promotes tumor survival and provides a target for therapy. *FASEB J*. 2008; 22: 3525-3536.

Tagaya M, Nakata S, Yasuma F, Miyazaki S, Sasaki F, Morinaga M, Suzuki K, Otake H, Nakashima T. Relationship between adenoid size and severity of obstructive sleep apnea in preschool children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012 Dec;76(12):1827-30.

Takasaki J, Kamohara M, Matsumoto M, Saito T, Sugimoto T, Ohishi T, Ishii H, Ota T, Nishikawa T, Kawai Y, Masuho Y, Isogai T, Suzuki Y, Sugano S, Furuichi K. The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 274(2):316–322.

Tan HL, Gozal D, Kheirandish-Gozal L. Obstructive sleep apnea in children: a critical update. *Nat Sci Sleep*. 2013 Sep 25;5:109-23.

Thivierge M, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Cysteinyl-leukotriene receptor type 1 expression and function is down-regulated during monocyte-derived dendritic cell maturation with zymosan: involvement of IL-10 and prostaglandins. *J Immunol*. 2009 Nov 15;183(10):6778-87.

Tsaoussoglou M, Lianou M, Maragozidis P, Hatzinikolaou S, Mavromati M, Orologas N, Panaghiotopoulou-Gartagani P, Rassidakis G, Balatsos NA, Chrousos G, Kaditis AG. Cysteinyl leukotriene receptors in tonsillar B- and T-lymphocytes from children with obstructive sleep apnea. *Sleep Medicine*. 2012;13; 879–85

Tsaoussoglou M, Hatzinikolaou S1, Baltatzis GE, Lianou L, Maragozidis P, Balatsos NA, Chrousos G, Kaditis AG. Expression of leukotriene biosynthetic enzymes in tonsillar tissue of children with obstructive sleep apnea: a prospective nonrandomized study. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014 Oct;140(10):944-50.

van den Akker EH, Sanders EA, van Staaik BK, Rijkers GT, Rovers MM, Hoes AW, Schilder AG. Long-term effects of pediatric adenotonsillectomy on serum immunoglobulin levels: results of a randomized controlled trial. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006 Aug;97(2):251-6.

Venerito M, Kuester D, Harms C, Schubert D, Wex T, Malfertheiner P. Upregulation of leukotriene receptors in gastric cancer. *Cancers (Basel)*. 2011 Aug 8;3(3):3156-68.

Weatherly RA, Ruzicka DL, Marriott DJ, Chervin RD. Polysomnography in children scheduled for adenotonsillectomy. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Nov;131(5):727-31.

Wipfler D, Srinivasan GV, Sadick H, Kniep B, Arming S, Willhauck-Fleckenstein M, Vlasak R, Schauer R, Schwartz-Albiez R. Differentially regulated expression of 9-O-acetyl GD3 (CD60b) and 7-O-acetyl-GD3 (CD60c) during differentiation and maturation of human T and B lymphocytes. *Glycobiology*. 2011 Sep;21(9):1161-72.

Xue L, Fergusson J, Salimi M, Panse I, Ussher JE, Hegazy AN, Vinall SL, Jackson DG, Hunter MG, Pettipher R, Ogg G, Klenerman P. Prostaglandin D2 and leukotriene E4 synergize to stimulate diverse TH2 functions and TH2 cell/neutrophil crosstalk. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 May;135(5):1358-66.

Yellon RF. Is polysomnography required prior to tonsillectomy and adenoidectomy for diagnosis of obstructive sleep apnea versus mild sleep disordered breathing in children? *Laryngoscope*. 2010; May;120(5):868-9.

Zhang WP, Hu H, Zhang L, Ding W, Yao HT, Chen KD, Sheng WW, Chen Z, Wei EQ. Expression of cysteinyl leukotriene receptor 1 in human traumatic brain injury and brain tumors. *Neurosci Lett*. 2004; 363: 247-251.

Zhu J, Qiu YS, Figueroa DJ, Bandi V, Galczynski H, Hamada K, Guntupalli KK, Evans JF, Jeffery PK. Localization and upregulation of Cysteinyl Leukotriene-1 receptor in asthmatic bronchial mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005; 33(6):531–540

Apêndice 1

Artigo publicado no Inflammation Journal

AUTHOR'S PROOF

JrnID 10753_ArtID 357_Proof# 1 - 18/04/2016

Inflammation (© 2016)
DOI: 10.1007/s10753-016-0357-8

1
3
3
4

ORIGINAL ARTICLE

5 Expression of CysLTR1 and 2 in Maturing Lymphocytes 6 of Hyperplasic Tonsils Compared to Peripheral Cells 7 in Children

8 Bruno Peres Paulucci,^{1,5} Juliana Pereira,² Patricia Picciarelli,³
9 Debora Levy,⁴ and Renata Cantisani di Francesco¹

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
30

Abstract—Cysteinyl-leukotriene receptors 1 and 2 (CysLTR1 and 2) are related to allergic inflammatory responses. Recent studies demonstrated their role in lymphocyte division and maturation in the bone marrow. Few data are available about CysLTRs function in lymphocyte maturation in tonsils. The objectives of this study are to compare CysLTRs expression in peripheral blood lymphocytes with expression in maturing lymphocytes of hyperplasic tonsil and to check the influence of respiratory allergies in this process. Leukocytes of peripheral blood (PL) and hyperplasic tonsils of children were immunostained for CysLTR1, CysLTR2, CD3 (T cells), and CD19 (B cells) and read in flow cytometer. Lymphocyte of tonsils were divided in differentiating small cells (SC) and mitotic large cells (LC); percentage of B and T cells expressing CysLTRs was determined, and comparison was done using ANOVA and Tukey's tests. Data were analyzed as a whole and categorize patients according the presence of allergies. Sixty children were enrolled in this study. There was a large expression of CysLTR1 and 2 in CD3+ LC, and such expression decreased progressively in SC and PL. In B cells, the highest expression of CysLTR1 and 2 was found in PL while SC showed the lowest and LC showed the highest expression. This pattern kept unchanged in groups of allergic and non-allergic individuals. CysLTRs seem to be involved in lymphocyte maturation that occurs in tonsils, without influence of allergies. New studies aiming the clinic treatment of tonsil hyperplasia must be targeted to the development of drugs capable of blocking both CysLTR1 and 2.

KEY WORDS: lymphocytes; leukotriene; allergy; tonsil; maturation.

Apêndice 2

Artigo publicado no International Forum of Allergy & Rhinology

Author Proof

Expression of cysteinyl leukotriene receptor 1 and 2 (CysLTR1 and CysLTR2) in the lymphocytes of hyperplastic tonsils: comparison between allergic and nonallergic snoring children

Bruno Peres Paulucci¹, Juliana Pereira², Patricia Picciarelli³, Debora Levy⁴ and Renata Cantisani di Francesco¹

Background: Cysteinyl leukotriene receptor 1 and 2 (CysLTR1 and CysLTR2) are involved in allergic processes and play a role in adenotonsillar hyperplasia (AH). Clinically, only CysLTR1 may be blocked by montelukast. Our objective was to compare the expression of CysLTR1 and CysLTR2 in the B and T cells of hyperplastic tonsils of sensitized (SE) and control (NS) snoring children.

Methods: Sixty children, 5 to 10 years of age, referred for adenotonsillectomy, were divided into SE and NS groups, according to their responses to the skin-prick test. Cells from the removed tissues were stained for CysLT1R, CysLT2R, CD19, and CD3 and counted via flow cytometry. messenger RNA (mRNA) expression of the CysLTR genes was measured using reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

Results: The SE group showed reduced expression of the small CD3+/CysLTR1+ lymphocytes (4.6 ± 2.2 vs 6.5 ± 5.0 ; $p = 0.04$). Regarding the large lymphocytes, the SE group showed lower expression of CD3+/CysLTR1+ (40.9 ± 14.5 vs 47.6 ± 11.7 ; $p = 0.05$), CD19+/CysLTR1+ (44.6 ± 16.9 vs 54.1 ± 12.4 ; $p = 0.01$), and CD19+/CysLTR2+ (55.3 ± 11.3 vs 61.5 ± 12.6 ; $p = 0.05$) lymphocytes. Considering the total number of lymphocytes, the SE group had fewer CD3+/CysLTR1+ lymphocytes (11.1 ± 5.5 vs $13.7 \pm$

6.2 ; $p = 0.04$). All other cell populations exhibited reduced expression in the SE group without statistical significance. The expression of CysLT2R was significantly higher ($p < 0.05$) than CysLT1R in most studied cell populations. The mRNA expression did not show significant differences between the groups.

Conclusion: The expression of CysLTR is higher in the lymphocytes of the NS children, and CysLT2R shows greater expression than CysLT1R. Respiratory allergies do not appear to be a stimulus for AH occurrence. Newer drugs capable of blocking both CysLTRs warrant further study. © 2016 ARS-AAOA, LLC.

Key Words: cysteinyl leukotriene receptor; lymphocyte; tonsil; allergy; hyperplasia

How to Cite this Article:

Paulucci BP, Pereira J, Picciarelli P, Levy D, di Francesco RC. Expression of cysteinyl leukotriene receptor 1 and 2 (CysLTR1 and CysLTR2) in the lymphocytes of hyperplastic tonsils: comparison between allergic and nonallergic snoring children. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2016;XX:XXX-XXX.

Apêndice 3

Certificado de apresentação oral no 3^o Congresso Europeu de Otorrinolaringologia (Praga- 2015)



CONFIRMATION

We hereby confirm that **Renata Di Francesco** presented following **Free Papers**:

FP-041

1. EXPRESSION OF LEUKOTRIENE RECEPTORS 1 AND 2 IN THE CELLULAR SURFACE OF B AND T LYMPHOCYTES OF HYPERPLASIC ADENOIDS OF CHILDREN: COMPARISON BETWEEN ALLERGIC AND NON-ALLERGIC

Authors: Paulucci B. P., Di Francesco R. C., Pereira J., Picciarelli P., Bento R. F. (Brazil)


2. CYSLT1R AND CYSLT2R IN LYMPHOCYTES: COMPARISON BETWEEN PERIPHERAL AND TONSILLAR CELLS

Authors: Paulucci B. P., Di Francesco R. C., Pereira J., Picciarelli P., Bento R. F. (Brazil)

Round Table :

RT-101

Tonsillotomy / Tonsillectomy: THE ROLE OF CRANIOFACIAL MORPHOLOGY IN THE FAILURE OF ADENOTONSILLECTOMY AS PRIMARY TREATMENT FOR CHILDHOOD SLEEP APNEA



Prof. MUDr. Jan Betka, DrSc., FCMA
Congress president
3rd Congress of European ORL-HNS

Apêndice 4:

Certificado de apresentação de pôster no 62º Congresso da Sociedade Portuguesa de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial/ 8º Congresso Luso-Brasileiro de ORL (Porto- 2015).



CERTIFICADO

Certifica-se que o resumo com o título "EXPRESSÃO DOS RECEPTORES 1 E 2 DE LEUCOTRIENOS NA SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS B E T DE TONSILAS FARÍNGEAS HIPERPLÁSICAS DE CRIANÇAS: COMPARAÇÃO ENTRE ALÉRGICOS E NÃO ALÉRGIC", submetido por Bruno Paulucci¹, Pereira J.², Picciarelli P.², Di Francesco, R¹ (¹Departamento de Otorrinolaringologia Universidade de São Paulo, ² Departamento de Hematologia da Universidade de São Paulo), foi apresentado no 62º Congresso Nacional da SPORL | 8º Congresso Luso-Brasileiro de ORL | IX Reunião Luso-Galaica de ORL sob a forma de Poster, na sessão Posters.



SPORL
SOCIEDADE PORTUGUESA
DE OTORRINOLARINGOLOGIA
E CIRURGIA CÉRVICO-FACIAL



Carlos Ribeiro
Presidente da Sociedade Portuguesa de Otorrinolaringologia
e Cirurgia Cérvico-Facial


Apêndice 5:

Mensagem de aceite para apresentação oral no Encontro Anual da Academia Americana de Otorrinolaringologia- 2016

AAO-HNSF Scientific Oral Presentation 8 de Maio de 2016 16:52

De: Tamara Rollins

Para: brunopaulucci@usp.br



Dear Dr. Paulucci,

Congratulations! This is to inform you that the Scientific Program Oral Presentation **'Role of CysLTR1 and 2 in the Maturation of Lymphocytes in Tonsils'** submitted to the American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery Foundation for presentation at the 2016 Annual Meeting & OTO EXPOSM in San Diego, CA., has been accepted for presentation.

This Oral Presentation will be given a five-minute time slot. Limit presentation to 5-6 slides, approximately three-minutes should be dedicated to your presentation and two-minutes for audience question and answers.

Presentation Date: Sunday, September 18, 2016
Time Block: 3:30 PM - 4:30 PM
Presentation Position within Time Block: 9

In the coming weeks you will receive additional correspondence from us regarding your presentation. As a reminder, registration and housing for the Annual Meeting is now open. All speakers are required to register and present during their scheduled presentation date and time, please email programs@entnet.org if you have any questions.

We look forward to having you share your expertise and knowledge with our 2016 attendees.

Best regards,

Eben L. Rosenthal, MD
Coordinator, Scientific Program
American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery Foundation

Apêndice 6: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA E RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1.TITULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Análise da expressão dos receptores 1 e 2 de leucotrienos na população de linfócitos B e T tonsilares em crianças hiperplasia adenoamigdaliana: comparação entre alérgicos e não alérgicos”

2. PESQUISADORA: Profa. Dra. Renata C. Di Francesco

CARGO/ FUNÇÃO: Médico

INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL: 78935

Unidade do HCFMUSP: Divisão de Otorrinolaringologia- Instituto Central

PESQUISADOR EXECUTANTE: Bruno Peres Paulucci

CARGO/ FUNÇÃO: Médico

INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL: 115994

Unidade do HCFMUSP: Divisão de Otorrinolaringologia- Instituto Central

3.AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

RISCO MÍNIMO ()

RISCO MÉDIO ()

RISCO BAIXO (X)

RISCO MAIOR ()

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

HCFMUSP

Sr. Pai/ Responsável

Seu filho (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa para verificar se as doenças alérgicas estão envolvidas no crescimento das amígdalas e da adenoide:

- 1- O objetivo do presente estudo é avaliar a quantidade e os tipos de células imunológicas (de defesa) presentes nas amígdalas e adenoide de seu filho. Células são as menores unidades que formam o nosso organismo;
- 2- Inicialmente ele será submetido a um “teste alérgico”, que serve para saber se seu (a) filho (a) tem alergia a alguma substância normalmente presente no ar. Esse teste é feito através de diversas picadas superficiais na pele dos dois braços.
- 3- Após o teste alérgico, seu (a) filho (a) será submetido a cirurgia de adenoamigdalectomia por apresentar roncos e dificuldade de dormir devido ao crescimento excessivo das amígdalas e da adenoide, conforme indicação dos médicos da Divisão de ORL que fizeram o diagnóstico e acompanhamento.
- 4- A cirurgia será realizada seguindo a rotina de todas as adenoamigdalectomias realizadas semanalmente neste hospital; será feita em centro cirúrgico pelos médicos otorrinolaringologistas com a criança sob anestesia geral. As amígdalas e a adenoide removidas são normalmente descartadas após a cirurgia. Pedimos que autorize que as amígdalas e a adenoide retiradas de seu filho (a) sejam encaminhadas para uma avaliação em laboratório, na qual será contada a quantidade e os tipos de células (linfócitos) que elas contém.
- 5- Seu filho (a) inicialmente sentirá o desconforto relacionado ao teste alérgico. As pequenas picadas que ele sentirá no braço são superficiais e causam pequena dor; após alguns minutos podem causar coceira. Após o teste, ele sentirá o desconforto relacionado à cirurgia.
- 6- A participação do seu filho (a) no estudo trará a ele (a) o incômodo da realização do teste alérgico, pois esse teste nem sempre é realizado antes das cirurgias de amígdalas e adenoide. No entanto, esse teste nos permitirá saber

se seu filho (a) tem alguma alergia respiratória e quais os principais agentes dessa alergia.

- 7- A análise das amígdalas e adenoide de seu filho não lhe trarão um benefício direto, porém nos ajudará a determinar o método para pesquisar o motivo pelo qual as amígdalas e adenoide aumentam de tamanho em algumas crianças.
- 8- Caso seu filho não participe do presente estudo, ele seguirá normalmente a rotina de cirurgias no hospital, sem nenhuma interferência negativa (punição) pela não-participação.
- 9- Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Renata C. Di Francesco e o pesquisador executante o Dr. o Dr. Bruno Peres Paulucci, que podem ser encontrado no endereço Av Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 255- 6º andar. Telefone 11 3069-6288. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)- Rua Ovídio Pires de Campos, 255- 5º andar- tel 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20. E-mail cappesq@hcnet.usp.br
- 10- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento de seu filho (a) na instituição;
- 11- As informações obtidas serão analisadas e não será divulgada a identificação do paciente. O prontuário médico de seu filho será consultado.
- 12- Você pode conhecer os resultados parciais da pesquisa ou dados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.
- 13- Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- 14- Os pesquisadores utilizarão os dados coletados apenas para pesquisa científica.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise da expressão dos receptores 1 e 2 de leucotrienos na população de linfócitos B e T tonsilares em crianças hiperplasia adenoamigdaliana: comparação entre alérgicos e não alérgicos”

Eu discuti com a Dra Renata Cantisani di Francesco e com o Dr. Bruno Peres Paulucci sobre a minha decisão em permitir a participação de meu filho (a) neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em permitir a participação de meu filho (a) neste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no atendimento de meu filho (a) neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Apêndice 7: Protocolo de Pesquisa

HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Protocolo de pesquisa

“Análise da expressão dos receptores 1 e 2 de leucotrienos na população de linfócitos B e T em tonsilas hiperplásicas de crianças: comparação entre alérgicos e não alérgicos”

1- IDENTIFICAÇÃO

NOME:.....RGHC:

DATA CONSULTA:/...../..... DATANASCIMENTO:/...../.....

IDADE ATUAL: () anos, () meses SEXO : .M () F ()

2- AMIGDALITES

Numero de amigdalites bacterianas nos últimos 24 meses: _____

3- ANTECEDENTES PESSOAIS RELEVANTES:

4- Pontuação no PSQ (abaixo): _____

5- EXAME FÍSICO

a) Peso: _____ Kg

b) b) Altura: _____ m

c) IMC: _____ Kg/ m²

d) Intervalo de percentil (tabela OMS):

e) Rinoscopia: cornetos inferiores

() 1- grau 0 () 2- grau 1 () 3- grau 2 () 4- grau 3 () 5- grau 4

f) Orosopia: amígdalas

() 1- grau 1 () 2- grau 2 () 3- grau 3 () 4- grau 4

g) Otoscopia

() 1- normal () 2- OMS () 3- MT perfurada () 4- MT retraída

6- EXAMES COMPLEMENTARES

a) Radiografia de cavum: razão A/N: ____%

b) Nasofibrosopia: adenoide ocluindo rinofaringe em ____%

c) AUDIOMETRIA TONAL

() Normal bilateral

() Normal à () direita () esquerda

() Gap Unilateral _____ dB à () direita () esquerda

() Gap bilateral: Direita: _____ dB

Esquerda: _____ dB

() Misto

IMC	Categoria	IMC	Categoria
0- 1	1	50-75	7
1-3	2	75-85	8
3-5	3	85-95	9
5-15	4	95-97	10
15-25	5	97-99	11
25-50	6		

d) IMITANCIOMETRIA

Curva A () direita () esquerda

Curva B () direita () esquerda

Curva C () direita () esquerda

PSQ

Enquanto dorme, o seu filho...	Sim	Não	Não sabe
A1 ... ressona mais de metade do tempo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
A2 ... ressona sempre?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
A3 ... ressona alto?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
A4 ... tem uma respiração pesada ou ruidosa?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
A5 ... tem dificuldade ou faz um grande esforço para respirar?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Já alguma vez...			
A6 ... viu o seu filho parar de respirar durante a noite?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
O seu filho...			
A7 ... tem tendência a respirar pela boca durante o dia?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
A8 ... acorda de manhã com a boca seca?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
A9 ... costuma fazer ocasionalmente xixi na cama?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
O seu filho...			
B1 ... acorda de manhã com muito sono?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B2 ... apresenta sonolência durante o dia?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B3 A professora ou outro responsável comentou que o seu filho parece sonolento durante o dia?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B4 É difícil acordar o seu filho de manhã?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B5 O seu filho acorda com dores de cabeça de manhã?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B6 Alguma vez o seu filho parou de crescer ao ritmo normal desde o nascimento?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B7 O seu filho tem excesso de peso?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
O seu filho...			
C1 ... parece não ouvir quando estão a falar diretamente com ele	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C2 ... tem dificuldade em organizar tarefas e atividades	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C3 ... é facilmente distraído por estímulos externos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C4 ... Mexe constantemente com as mãos e os pés e remexe-se na cadeira	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C5 ... é irrequieto ou comporta-se como se "tivesse sempre as pilhas ligadas"	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C6 ... interrompe ou intromete-se com os outros (por exemplo, em conversas ou em jogos)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

e) PROCEDIMENTOS INDICADOS

() A2

() Timpanotomia

() direita

() esquerda

() Outro: _____

f) TESTE CUTÂNEO

Blomia tropicalis _____ mm
Dermatophagoides pteronyssinus _____ mm
Dermatophagoides farinae _____ mm
Alternaria alternata _____ mm
Aspergillus fumigatus _____ mm
Penicillium notatum _____ mm
Felis domesticus _____ mm
Canis familiaris _____ mm
Periplaneta americana _____ mm
Blatella germanica _____ mm

Controle positivo _____ mm

Controle negativo _____ mm

Grupo incluído:

() ALÉRGICOS

() NÃO-ALÉRGICOS

g) DATA DA CIRURGIA: ____/____/____

h) AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA

() 1- hiperplasia tecidual

() 2- outro

H) CITOMETRIA DE FLUXO:

TONSILAS

		Tons. Faríngea	Tons. Palatina
CÉLULAS PEQUENAS	% do total de células da tonsila		
	% células CD3+		
	% de células CD3+ expressando CysLT1R		
	% de células CD3+ expressando CysLT2R		
	% células CD19+		
	% de células CD19+ expressando CysLT1R		
	% de células CD19+ expressando CysLT2R		

CÉLULAS GRANDES	% do total de células da tonsila		
	% células CD3+		
	% de células CD3+ expressando CysLT1R		
	% de células CD3+ expressando CysLT2R		
	% células CD19+		
	% de células CD19+ expressando CysLT1R		
	% de células CD19+ expressando CysLT2R		

TODAS CÉLULAS	% do total de células da tonsila		
	% células CD3+		
	% de células CD3+ expressando CysLT1R		
	% de células CD3+ expressando CysLT2R		
	% células CD19+		
	% de células CD19+ expressando CysLT1R		
	% de células CD19+ expressando CysLT2R		

SANGUE PERIFÉRICO

% do total de leucócitos	
% células CD3+	
% de células CD3+ expressando CysLT1R	
% de células CD3+ expressando CysLT2R	
% células CD19+	
% de células CD19+ expressando CysLT1R	
% de células CD19+ expressando CysLT2R	

RT-qPCR

RNAm CysLT1R/ β -actina	
RNAm CysLT2R/ β -actina	