

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Patologia

Ingrid Caroline Silva Dias

**SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS: intervalo de referência e associação com idade,
sexo, hábitos de vida e sintomas de depressão e ansiedade em participantes do Estudo
Longitudinal de Saúde do Adulto – ELSA-BRASIL**

Belo Horizonte

2025

Ingrid Caroline Silva Dias

SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS: intervalo de referência e associação com idade, sexo, hábitos de vida e sintomas de depressão e ansiedade em participantes do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto – ELSA-BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor(a) em Patologia.

Orientador:

Prof. Dr. Pedro Guatimosim Vidigal

Coorientadoras:

Profa. Dra. Chams Bicalho Maluf

Profa. Dra. Sandra Guerra Xavier

Belo Horizonte

2025

043

Dias, Ingrid Caroline Silva.

Subpopulações de linfócitos: intervalo de referência e associação com idade, sexo, hábitos de vida e sintomas de depressão e ansiedade em participantes do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto – ELSA-BRASIL [manuscrito] / Ingrid Caroline Silva Dias. – 2025.

178 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Guatimosim Vidigal. Coorientadoras: Profa. Dra. Chams Bicalho Maluf; Profa. Dra. Sandra Guerra Xavier.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Subpopulações de Linfócitos. 3. Citometria de Fluxo. 4. Estilo de Vida. 5. Valor de referência (medicina). I. Vidigal, Pedro Guatimosim. II. Maluf, Chams Bicalho. III. Xavier, Sandra Guerra. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG - ICB/UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Subpopulações de Linfócitos: Intervalo de Referência e Associação com Idade, Sexo, Hábitos de Vida e Sintomas de Depressão e Ansiedade em Participantes do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto – ELSA-BRASIL”

INGRID CAROLINE SILVA DIAS

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia**, como requisito para obtenção do grau de **Doutor em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 11 de agosto de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Dr. Gustavo Oliveira Gonçalves, Faculdade de Minas/FAMINAS-BH

Profa. Dra. Silvana Maria Eloi Santos, FM/UFMG

Profa. Dra. Ana Paula Lucas Mota, FAFAR/UFMG

Profa. Dra. Luciana Araújo Oliveira Cunha, Faculdade Ciências Médicas de Minas Gerais

Profa. Dra. Sandra Guerra Xavier, FM/UFMG – COORIENTADORA

Profa. Dra. Chams Bicalho Maluf, FM/UFMG – COORIENTADORA

Prof. Dr. Pedro Guatimosim Vidigal, FM/UFMG – ORIENTADOR

Belo Horizonte, 11 de agosto de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Guatimosim Vidigal**, Professor do **Magistério Superior**, em 20/08/2025, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Oliveira Gonçalves**, Usuário Externo, em 20/08/2025, às 15:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Guerra Xavier**, Professora do **Magistério Superior**, em 20/08/2025, às 15:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvana Maria Eloi Santos**, Professor(a), em 20/08/2025, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota**, Professora do **Magistério**



Superior, em 20/08/2025, às 19:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Chams Bicalho Maluf, Professora do Magistério Superior**, em 21/08/2025, às 12:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Araujo Oliveira Cunha, Médica**, em 29/08/2025, às 13:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4461426** e o código CRC **DD464DA0**.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua graça e misericórdia que me sustentaram e me trouxeram até aqui. Por seu amor e bondade que me permitiram combater o bom combate, terminar a carreira e guardar a fé.

Ao professor Pedro Guatimosim Vidigal, às professoras Chams Bicalho Maluf e Sandra Guerra Xavier por serem grandes exemplos e por me orientarem de forma segura com sabedoria, respeito e carinho.

À toda equipe do Projeto ELSA do centro de investigação de Minas Gerais, em especial a equipe do laboratório, pela amizade, carinho e suporte durante essa trajetória.

Aos participantes do ELSA-Brasil, por possibilitarem a realização dessa pesquisa.

Ao Judson, Daniel e Aurea do laboratório da DIP por me acolherem e me ensinarem com leveza e paciência.

Aos meus pais, Catia e Vantuir, por todo o suporte, incentivo e amor. Por serem um porto seguro nos dias turbulentos.

Aos meus irmãos pelo apoio e incentivo na vida acadêmica, por celebrarem comigo as minhas conquistas.

À “Vó” que tão cedo partiu, mas deixou um legado de força, sabedoria e honra que marcaram o meu coração. Que Deus me permita ter uma vida honrada como a dela.

Aos meus amigos, todos em especial, pelo carinho, por acreditarem em mim, pelas orações, por ouvirem meus desabafos e por entenderem minhas constantes ausências em muitos momentos.

*Então, a nossa boca se encheu de riso; a nossa língua, de cantos de alegria.
Até nas outras nações se dizia: O Senhor fez coisas grandiosas por este povo.
Sim, coisas grandiosas fez o Senhor por nós; por isso, estamos alegres.
Aqueles que semeiam com lágrimas colherão com cânticos de alegria.
Aquele que sai chorando, enquanto lança a semente, voltará com cantos de alegria, trazendo
os seus feixes.
Salmos 126:2-3,5 6*

RESUMO

Há um interesse na determinação de subpopulações de linfócitos T, B e células natural killer (NK), pois esses valores são utilizados no diagnóstico e monitoramento da terapia em uma ampla variedade de condições clínicas, como imunodeficiências primárias ou adquiridas. A maioria dos intervalos de referência de subpopulações de linfócitos utilizados são baseados em dados originados de outros países. Estudos sugerem que as subpopulações linfocitárias podem sofrer influência de fatores como idade, sexo, hábitos de vida e distúrbios emocionais como ansiedade e depressão. O objetivo deste estudo foi estabelecer intervalos de referência para subpopulações de linfócitos no sangue periférico e avaliar potenciais variações por sexo e faixa etária, bem como avaliar a distribuição de subpopulações de linfócitos e sua associação com hábitos de vida, doenças crônicas, depressão e ansiedade em participantes do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto – ELSA-Brasil. As subpopulações de linfócitos de 351 participantes foram analisadas usando o analisador hematológico automatizado Sysmex XN-3000 e o citômetro de fluxo de quatro cores FACSCalibur. Os intervalos de referência foram estabelecidos usando os percentis 2,5 e 97,5. O escore Z foi empregado para verificar a necessidade de intervalos de referência distintos por sexo e faixa etária. O teste de Mann-Whitney, com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$ e IC 95% foi conduzido para identificar diferenças entre os grupos populacionais. Usamos análise de regressão robusta para estimar a associação das contagens de subpopulações de linfócitos com idade, sexo, índice de massa corporal, tabagismo, uso de álcool, atividade física, diabetes e hipertensão. Os intervalos de referência definidos foram: linfócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$): 1,0 - 2,9; linfócito T: 721,0 – 2311,5 células/ μL , 59,1 - 84,5%; linfócito T auxiliar: 421,4 – 1523,8 células/ μL , 32,5 - 61,6%; linfócito T citotóxico: 175,3 – 879,8 células/ μL , 12,3 - 39,1%; relação linfócito T auxiliar/linfócito T citotóxico: 0,8 - 4,1 células/ μL ; linfócito B CD19+: 85,2 - 501,6 células/ μL , 5,6 - 21,0%; células NK: 83,9 – 444,4 células/ μL , 4,3 - 23,5%. Diferenças significativas foram observadas nos valores relativos e absolutos da maioria das subpopulações de linfócitos quanto a sexo e idade. Após ajustes, foi demonstrado que com o aumento da idade, houve redução no total de linfócitos, linfócitos T, linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, linfócitos B e aumento nas células NK. As mulheres apresentaram aumento nos linfócitos T auxiliares, na proporção de linfócitos T auxiliares/linfócitos T citotóxicos, linfócitos B e diminuição nas células NK. Na obesidade, houve aumento nos linfócitos totais, linfócitos T, linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B. Finalmente, o tabagismo foi associado a aumento nos linfócitos totais, linfócitos T, linfócitos T auxiliares e linfócitos B. Já na depressão diferenças significativas foram observadas nos valores relativos de linfócitos T e linfócitos T auxiliares e nos valores absolutos e relativos das células NK. Os resultados sugerem que as subpopulações de linfócitos podem ser influenciadas por sexo, idade, tabagismo e obesidade, destacando que devemos considerar intervalos de referência separados para homens e mulheres, particularmente para linfócitos T auxiliares, linfócitos B e células NK.

Palavras-chave: Valor de referência; Subpopulações de linfócitos; Citometria de fluxo; Hábitos de vida.

ABSTRACT

There is interest in determining subpopulations of T and B lymphocytes and natural killer (NK) cells, as these values are used in the diagnosis and monitoring of therapy in a wide variety of clinical conditions, such as primary and acquired immunodeficiencies. Most reference ranges for lymphocyte subpopulations used are based on data from other countries. Studies suggest that lymphocyte subpopulations may be influenced by factors such as age, sex, lifestyle habits, and emotional disorders such as anxiety and depression. The objective of this study was to establish reference ranges for lymphocyte subpopulations in peripheral blood and evaluate potential variations by sex and age group, as well as to assess the distribution of lymphocyte subpopulations and their association with lifestyle habits, chronic diseases, depression, and anxiety in participants of the Longitudinal Study of Adult Health – ELSA-Brasil. Lymphocyte subpopulations from 351 participants were analyzed using a Sysmex XN-3000 automated hematology analyzer and a FACSCalibur four-color flow cytometer. Reference intervals were established using the 2.5th and 97.5th percentiles. The Z-score was used to assess the need for different reference intervals by sex and age group. The Mann-Whitney test, with a significance level set at $p < 0.05$ and 95% CI, was performed to identify differences between population groups. We used robust regression analysis to estimate the association of lymphocyte subpopulation counts with age, sex, body mass index, smoking, alcohol use, physical activity, diabetes, and hypertension. The defined reference intervals were: total lymphocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$): 1.0–2.9; T lymphocytes: 721.0–2311.5 cells/ μL , 59.1–84.5%; T helper lymphocytes: 421.4–1523.8 cells/ μL , 32.5–61.6%; cytotoxic T lymphocyte: 175.3–879.8 cells/ μL , 12.3–39.1%; helper T lymphocyte/cytotoxic T lymphocyte ratio: 0.8–4.1 cells/ μL ; CD19+ B lymphocyte: 85.2–501.6 cells/ μL , 5.6–21.0%; NK cells: 83.9–444.4 cells/ μL , 4.3–23.5%. Significant differences were observed in the relative and absolute values of most lymphocyte subpopulations regarding sex and age. After adjustments, it was demonstrated that with increasing age, there was a reduction in total lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, and B lymphocytes, and an increase in NK cells. Women showed an increase in helper T lymphocytes, the helper T lymphocyte/cytotoxic T lymphocyte ratio, and B lymphocytes, while decreasing NK cells. Obesity also showed an increase in total lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, and B lymphocytes. Finally, smoking was associated with an increase in total lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, and B lymphocytes. In depression, significant differences were observed in the relative values of T lymphocytes and helper T lymphocytes and in the absolute and relative values of NK cells. The results suggest that lymphocyte subpopulations may be influenced by sex, age, smoking, and obesity, highlighting the need for separate reference ranges for men and women, particularly for helper T lymphocytes, B lymphocytes, and NK cells.

Keywords: Reference value; Lymphocyte subpopulations; Flow cytometry; Lifestyle habits.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos linfócitos Th1, Th2 e Th17	22
Figura 2. Representação esquemática do funcionamento do citômetro de fluxo	27
Figura 3. Gráficos do tipo histograma e Dot plot gerados na citometria de fluxo	28
Figura 4. Gráfico Dot plot gerado na citometria de fluxo com divisão em quadrantes.....	29
Figura 5. Seleção de regiões específicas (gates) na citometria de fluxo	30
Figura 6. Representação esquemática das etapas para determinação de IR	32
Figura 7. Representação esquemática das etapas de preparo da amostra para citometria de fluxo	52
Figura 8. Gráficos com as populações celulares geradas pelo Multiset™	53
Figura 9. Identificação de células nos canais WNR e WDF do analisador hematológico Sysmex XN-3000	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Agrupamento dos participantes com depressão e ansiedade.....	50
Tabela 2. Especificações dos anticorpos monoclonais	51
Tabela 3. Componentes da variação biológica e especificações da qualidade analítica.....	57
Tabela 4. Distribuição de depressão e ansiedade na população do estudo	112
Tabela 5. Contagem de linfócitos totais e subpopulações de linfócitos em participantes com depressão	113
Tabela 6. Contagem de linfócitos totais e subpopulações de linfócitos em participantes com ansiedade	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo - Anticorpos monoclonais
APC - Aloficocianina
APCs - Células apresentadoras de antígenos
AR - Receptor de andrógeno
BASO - Basófilos
BCR - Receptor de células B
BIAS - Bias analítico - erro sistemático
CAR-T - *Chimeric antigen receptor cell*
CD - *Cluster* de diferenciação
CD19+ - Linfócitos B
CD3+ - Linfócito T
CD3+/CD4+ - Linfócitos T auxiliares
CD3+/CD8+ - Linfócitos T citotóxicos
CD3+CD4-CD8 - Linfócitos duplo-negativos
CIS-R - *Clinical Interview Scheduled Revised*
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMCD - Candidíase mucocutânea crônica
cNK - Células NK convencionais
COVID-19 - *Coronavirus Disease*
CVa - Coeficiente de variação analítico
CVg - Variação biológica intra-grupo
CVi - Variação biológica intra-indivíduo
CXCL7 - Ligante de Quimiocina 7
DCs - Células dendríticas
EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético
ELSA - Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto
EO – Eosinófilo
ER- α - Receptor de estrogênio alfa
ER- β - Receptor de estrogênio beta
ET - Erro total analítico permitido
FasL - Fas ligante
FC-B - Linfócitos B da zona folicular
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
FSC - *Forward Scatter*
GrB - Granzima citotóxica B
HIES - Síndrome de hiper IgE autossômica dominante
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
IFCC - *International Federation of Clinical Chemistry*
IFN- γ - Interferon-gama
IG- Granulócitos imaturos
Ig - Imunoglobulinas
IL – Interleucina
IPAQ - Questionário internacional de atividade física
IR - Intervalo de referência
ISQ - Questionário de estado imunológico
LINFO - Linfócitos

LT- α - Linfotoxina alfa
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
MONO - Monócitos
MZ-B - Linfócitos B da zona marginal
N - Número de participantes
NEUT - Neutrófilos
NRBC - Eritroblastos
NK - Células *natural killer*
OMS - Organização Mundial da Saúde
PCR - Proteína C reativa
PE - Ficoeritrina
PELM - Programa de Excelência para Laboratórios Médicos
PerCP - Complexo proteína piridina de clorofila
PNS - Pesquisa Nacional de Saúde
PR - Receptor de progesterona
RNS – Espécies reativas de nitrogênio
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SBPC/ML - Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial
SCID - Imunodeficiência combinada severa
SD - Desvio-padrão da média
SNC - Sistema nervoso central
T $\gamma\delta$ - Linfócitos T gama-delta
TC - Linfócitos T citotóxicos
TCR - Receptor de células T
Th - Linfócitos T helper
TNF- β - Fator de necrose tumoral beta
T-regs - Linfócitos T reguladores
trNK - Células NK residentes em tecidos
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UK NEQAS - *United Kingdom National External Quality Assessment Service*
WBC - Leucócitos
XLA - Gamaglobulinemia ligada ao X
Z - Z calculado
Z* - Z crítico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Sistema imunológico	18
2.2. Componentes celulares da resposta imune	20
2.3. Subpopulações de linfócitos	20
2.3.1. Linfócitos T	20
2.3.2. Linfócitos B.....	23
2.3.3. Células NK	25
2.4. Determinação das subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo	26
2.5. Intervalo de referência de linfócitos	31
2.6. Uso clínico das subpopulações de linfócitos	33
2.7. Fatores que influenciam as subpopulações de linfócitos.....	35
2.7.1. Idade	35
2.7.2. Sexo	36
2.7.3. Obesidade	37
2.7.4. Tabagismo	38
2.7.5. Uso de álcool.....	39
2.7.6. Atividade física.....	40
2.7.7. Diabetes mellitus	41
2.7.8. Hipertensão.....	42
2.8. Subpopulações de linfócitos na depressão e ansiedade	43

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	45
4. OBJETIVOS	46
4.1. Objetivos gerais	46
4.2. Objetivos específicos	46
5. MATERIAS E MÉTODOS	47
5.1. Tipo de estudo.....	47
5.2. População do estudo	47
5.2.1. População de estudo do Artigo 1	47
5.2.2. População de estudo do Artigo 2	48
5.2.3. População de estudo depressão e ansiedade	48
5.3. Variáveis do estudo	49
5.3.1. Faixa etária e hábitos de vida	49
5.3.2. Avaliação de depressão e ansiedade	50
5.4. Determinação das subpopulações de linfócitos	51
5.4.1. Imunofenotipagem	51
5.4.2. Análise dos dados	53
5.4.3. Controle da qualidade.....	55
5.4.4. Contagem absoluta de linfócitos	55
5.4.5. Comparação de métodos	56
5.5. Análise estatística	57
5.5.1. Análise dos dados do Artigo 1	57
5.5.2. Análise dos dados do Artigo 2	59

5.5.3. Análise dos dados de depressão e ansiedade	60
5.6. Aspectos éticos	60
6. RESULTADOS	61
6.1. Artigo 1: Establishing the reference intervals for subpopulations of t lymphocytes, b lymphocytes, and natural killer cells: insight from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-BRASIL)	62
6.2. Artigo 2: Lymphocyte subpopulations: distribution and association with sociodemographic factors, lifestyle, and chronic diseases in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-BRASIL)	85
6.3. Depressão e ansiedade	112
7. DISCUSSÃO	115
8. CONCLUSÃO	117
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	118
10. ANEXOS	132
Anexo 1. CIS-R - Clinical Interview Scheduled Revised	132
Anexo 2. Aprovação do comitê de ética da ELSA-BRASIL	171
Anexo 3. aprovação do comitê de ética da onda 3 do elsa-brasil	173

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é um sistema de defesa do hospedeiro responsável por proteger o corpo de microrganismos invasores, facilitar a cicatrização de feridas e prevenir doenças. Ele compreende inúmeras estruturas e processos biológicos que funcionam através de uma série de mecanismos coordenados, incluindo imunidade inata e adaptativa. O sistema imunológico inato é também conhecido como sistema imunológico inespecífico e inclui células e fatores solúveis, que representam a primeira linha de defesa contra patógenos. As principais células do sistema imunológico inato incluem neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) e células natural killer (NK). A imunidade adaptativa, conhecida como imunidade adquirida ou imunidade específica, se desenvolve ao longo do tempo e utiliza células altamente especializadas, os linfócitos T e B. Os linfócitos T desempenham um papel importante nas respostas imunes mediadas por células, enquanto os linfócitos B estão intimamente envolvidos na resposta imune humoral. O sistema imunológico não apenas protege nosso organismo contra diversas agressões, mas também influencia outros sistemas fisiológicos e seus processos, incluindo metabolismo, reparação tecidual, saúde mental, entre outros (DAËRON, 2022; WANG *et al.*, 2020).

Assim, a determinação dos níveis absolutos e relativos de linfócitos tem importância em uma série de situações clínicas, incluindo investigação de doenças autoimunes, infecções virais, tumores sólidos e doenças hematopoiéticas, rejeição de transplantes, alterações da homeostase linfocítica, imunodeficiências primárias e secundárias, e outras doenças com componentes imuno patogênicos (VILLEGAS-VALVERDE; KOKUINA; BREFF-FONSECA, 2018, 2020).

O intervalo de referência (IR) é utilizado para auxiliar na interpretação de resultados de testes laboratoriais na prática clínica e varia de acordo com a metodologia usada e a população estudada. O IR para as subpopulações de linfócitos auxilia no diagnóstico, na avaliação da progressão da doença e da resposta terapêutica (MÜLLER *et al.*, 2022; XIA *et al.*, 2022). Além das implicações individuais no uso de IR apropriados, estimar de forma adequada o IR também é importante em saúde pública. Por exemplo, subestimar o limite superior de um IR significaria classificar um grande número de pessoas como fora da faixa considerada normal (LIU; BRETZ; CORTINA-BORJA, 2021).

Mesmo sendo reconhecida a importância de se determinar o IR próprio, para a maioria dos testes laboratoriais os IR utilizados são obtidos em outras populações. A maioria dos IR de linfócitos T utilizados no Brasil é baseada em dados oriundos de outros países com populações de origem genética principalmente caucasiana. Considerando que a população brasileira apresenta grande diversidade étnica, além de diferentes características de estilo de vida, os IR definidos em outras populações podem ser inadequados para uso no nosso país (MORAIS *et al.*, 2023; TORRES *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2025).

Estudos sugerem que as subpopulações linfocitárias podem sofrer influência de alguns fatores como idade, sexo, hábitos de vida, fatores genéticos, localização geográfica, e até distúrbios emocionais como ansiedade e depressão (LYNALL *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2023; WONG *et al.*, 2013; XIA *et al.*, 2022).

Sendo assim, os objetivos do presente estudo foram determinar o IR das subpopulações de linfócitos e identificar se idade, sexo, hábitos de vida, obesidade, diabetes, hipertensão, depressão e ansiedade estão associadas ou não à distribuição das subpopulações de linfócitos em nossa população e seu potencial impacto na interpretação clínica desses parâmetros.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O sistema imunológico mantém a homeostase do organismo, utilizando de forma integrada as barreiras físicas, químicas, biológicas, componentes celulares, e moléculas solúveis em um processo altamente complexo. Nesta revisão, serão abordados os principais fundamentos dessa resposta, com destaque apenas para os componentes celulares da resposta imune, especialmente os linfócitos.

2.1. Sistema imunológico

O sistema imunológico é o defensor mais importante da integridade do corpo contra invasores externos ou patógenos, bem como fatores internos alterados ou modificados. Por esta razão, nosso sistema imunológico possui vários mecanismos sofisticados, tanto inatos quanto adaptativos, formados por diferentes populações de células, que são capazes de responder a esses desafios (MÜLLER; BENEDETTO; PAWELEC, 2019).

O sistema imunológico é classicamente dividido em dois tipos de respostas principais: inata e adaptativa. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra patógenos e é composta por barreiras como a pele, sistema complemento, citocinas e células – granulócitos (neutrófilo, basófilo, eosinófilo), monócitos/macrófagos, DCs e células NK (CARTY, 2021).

A característica fundamental do sistema imunológico inato é a resposta rápida, mas inespecífica, a um amplo repertório de patógenos e danos teciduais. É um mecanismo de defesa independente do antígeno e é usado pelo hospedeiro imediatamente ou logo após a exposição. A resposta imune inata não possui memória imunológica e, portanto, é incapaz de reconhecer ou “memorizar” o mesmo patógeno caso o corpo seja exposto a ele no futuro (MARSHALL *et al.*, 2018).

A resposta imune adaptativa fornece uma imunidade duradoura altamente específica a uma grande diversidade de antígenos. A resposta imune adaptativa é autolimitada e diminui rapidamente à medida que a infecção é eliminada e gera memória imunológica. A resposta imune adaptativa apresenta duas formas: a imunidade humoral, mediada por anticorpos produzidos por linfócitos B, e a imunidade celular, que é mediada por linfócitos T (LI; HUA, 2017).

A imunidade celular se refere a uma resposta imune adaptativa específica ativada por linfócitos Th1, que leva à ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos T citotóxicos. Esta resposta imune combate infecções intracelulares causadas por vírus, algumas bactérias, fungos e protozoários. A imunidade humoral é a resposta imune adaptativa específica, ativada por linfócitos Th2, que leva à produção de linfócitos B e anticorpos. Essa resposta imunológica combate infecções extracelulares, incluindo bactérias, fungos, protozoários e infecções parasitárias (STRZELEC *et al.*, 2023).

Os sistemas imunes inato e adaptativo são descritos como duas vias separadas e distintas; no entanto, ambos atuam em conjunto, sendo que a resposta inata atua como a primeira linha de defesa, e a resposta adaptativa atua à medida que os linfócitos T e B específicos para o antígeno sofrem expansão clonal. Embora as respostas inata e adaptativa sejam distintas nos seus mecanismos de ação, a cooperação entre elas é primordial para uma resposta imune intacta e efetiva (CHAPLIN, 2010).

2.2. Componentes celulares da resposta imune

Uma resposta imune intacta e efetiva depende da contribuição de muitos subconjuntos de leucócitos. Os leucócitos circulantes maduros originam-se das células-tronco hematopoiéticas. Essas células-tronco podem ser reconhecidas por seu próprio cluster de diferenciação, que são marcadores fenotípicos em sua superfície celular e podem ser obtidas da medula óssea, do sangue periférico e da placenta. A formação das células do sistema imunológico começa quando uma célula-tronco hematopoiética pluripotente se diferencia na célula progenitora mieloide comum ou no progenitor linfoide comum. O progenitor linfoide comum diferencia-se nas três principais populações de linfócitos maduros: linfócito B, linfócito T e células NK. As células-tronco mieloides dão origem aos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, plaquetas e eritrócitos (CHAPLIN, 2010).

2.3. Subpopulações de linfócitos

Os linfócitos originados das células-tronco pluripotentes na medula óssea sofrem um processo de maturação nos órgãos linfoides primários, que são a medula óssea e o timo. Após a maturação, os linfócitos migram através do sangue e da linfa para os órgãos linfoides secundários, que são os linfonodos, baço e tecido linfoide associado a mucosa (pele, trato respiratório, trato gastrointestinal), onde reconhecem os patógenos. Os linfócitos B, T e células NK diferem em relação às suas características fenotípicas e funcionais (SCULLY; GEORGAKOPOULOU; HASSONA, 2017a).

2.3.1. Linfócitos T

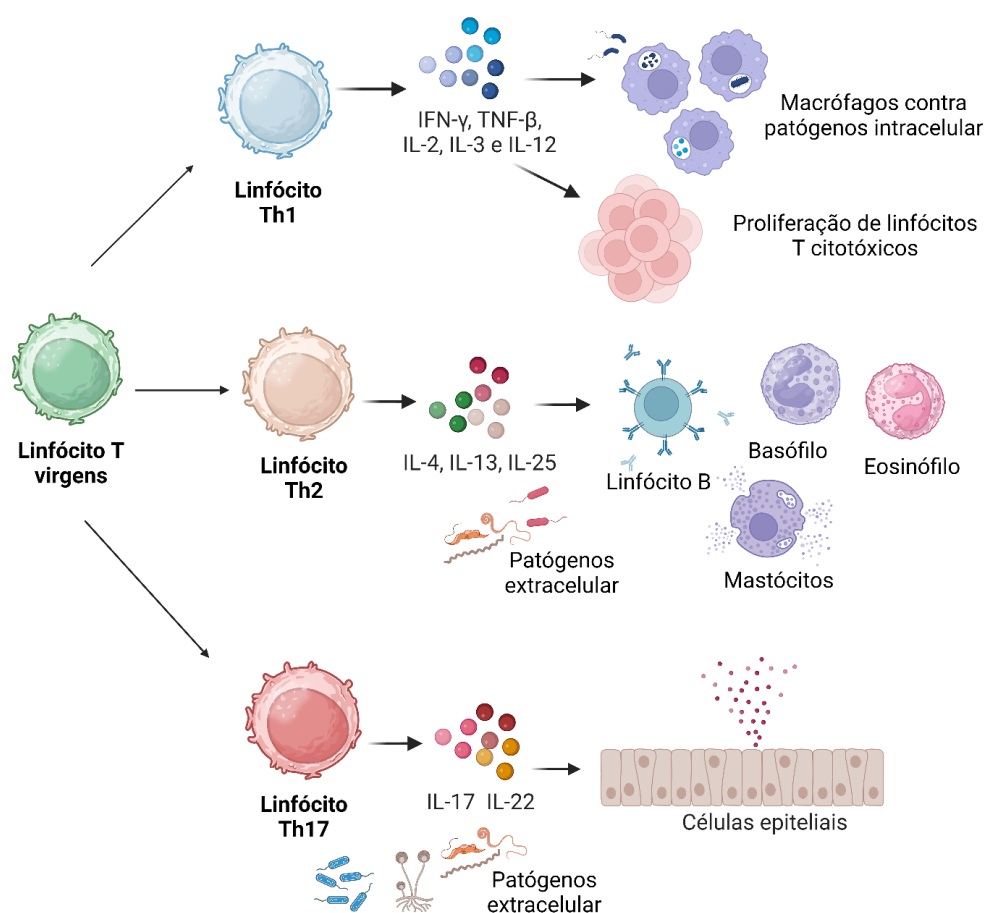
Os linfócitos T são importantes no combate a doenças provocadas por vírus, fungos e algumas bactérias como as micobactérias, por exemplo. Os linfócitos T também estão envolvidos em processos imunológicos como: rejeição de enxerto, reação do enxerto versus hospedeiro, hipersensibilidade tardia e na defesa contra células cancerígenas (SCULLY; GEORGAKOPOULOU; HASSONA, 2017b).

O reconhecimento de antígenos pelo linfócito T se dá através do receptor de células T (TCR), que reconhece apenas antígenos ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Os linfócitos T desenvolvem TCR à medida que amadurecem, e os que têm uma afinidade para se ligar ao MHC de classe II se tornarão linfócitos T helper. Outros linfócitos T, à medida que amadurecem, desenvolvem TCR que têm afinidade para se ligar ao MHC de classe I e se tornarão linfócitos T citotóxicos (Tc). Outros grupos de linfócitos T incluem linfócitos T gama-delta (células T $\gamma\delta$) e linfócitos T reguladores (Tregs) (SCULLY; GEORGAKOPOULOU; HASSONA, 2017b).

No processo evolutivo das células hematopoiéticas, pode-se encontrar a expressão de diferentes antígenos de superfície, citoplasma ou núcleo, padronizados universalmente como *cluster of differentiation* (CD), o que define a sua linhagem e o seu estágio de diferenciação ou maturação. Os linfócitos T são caracterizados fenotipicamente pela expressão de CD3. Os linfócitos Th ou T auxiliares são reconhecidos pela expressão de CD4 e os linfócitos T citotóxicos pela expressão de CD8. Assim, os linfócitos T auxiliares são caracterizados fenotipicamente pela expressão de CD3 e CD4. Eles ocupam um papel de destaque na resposta imune adaptativa, visto sua capacidade de recrutar outras células do sistema imunológico como linfócitos B, macrófagos, e até mesmo linfócitos T citotóxicos (MCCOMB *et al.*, 2019).

Os linfócitos T auxiliares virgens são ativados e se diferenciam em subconjuntos efetores especializados conhecidos como Th1, Th2 e Th17, que secretam diferentes citocinas e fatores estimuladores de colônias. Os linfócitos Th1 produzem interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral beta (TNF- β), interleucina (IL) 2, IL-3 e IL-12, envolvidas principalmente na resposta imune mediada por células e na inflamação. A resposta de perfil Th1 é importante para potencializar a ação dos macrófagos na eliminação de patógenos intracelulares, além de promover a proliferação de células T citotóxicas. Linfócitos Th2 produzem citocinas IL-4, IL-13 e IL-25, estimulando os linfócitos B a produzir anticorpos/imunoglobulinas (Ig): IgG, IgA e IgE. A resposta Th2 é importante na eliminação de patógenos extracelulares além de recrutar e ativar mastócitos, eosinófilos e basófilos. Linfócitos Th17 produzem citocinas IL-17 e IL-22 que estimulam as células epiteliais a produzirem proteínas antimicrobianas. A resposta Th17 é importante na defesa contra patógenos extracelulares que não foram eliminados de forma eficiente por outras células (Figura 1) (KÜNZLI; MASOPUST, 2023; SCULLY; GEORGAKOPOULOU; HASSONA, 2017b).

Figura 1. Representação esquemática dos linfócitos Th1, Th2 e Th17



Fonte: Elaborado pelo autor

Os linfócitos T citotóxicos são caracterizados fenotipicamente pela expressão de CD3 e CD8. Eles reconhecem peptídeos de origem citoplasmática apresentados via MHC-I, em especial, proteínas virais e antígenos tumorais. Os linfócitos T citotóxicos eliminam células infectadas por microrganismos intracelulares e atuam, principalmente, nas respostas contra infecções virais e controle de patógenos intracelulares, além de possuírem atividade antitumoral (FARHOOD; NAJAFI; MORTEZAEI, 2019).

O linfócito T citotóxico induz a morte celular por três mecanismos: secreção de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo o IFN- γ , que ativa os macrófagos; interação entre proteína Fas e a Fas ligante (FasL); e secreção de grânulos citolíticos. A Fas pode se ligar a outras proteínas como a FasL que está presente nos linfócitos T citotóxicos. Ao se ligar à célula alvo, a FasL se une à proteína Fas e ativa caspase 8, uma cisteína que inicia a sinalização da via

apoptótica. E pelo mecanismo de secreção de grânulos citolíticos, os linfócitos T citotóxicos secretam grânulos contendo perforina, que adere à membrana plasmática da célula infectada e danifica a sua estrutura criando poros, permitindo a entrada de proteases, incluindo granzima, que entra na célula e induz a apoptose (WIK; SKÅLHEGG, 2022).

2.3.2.Linfócitos B

Os linfócitos B são caracterizados fenotipicamente pela expressão de CD19 e são responsáveis pela imunidade humoral produzindo anticorpos capazes de neutralizar, ou até mesmo destruir, os antígenos contra os quais foram gerados. Além disso, os linfócitos B desempenham um papel fundamental na resposta imune adaptativa frente a infecções virais através da produção de moléculas efetoras, como granzima citotóxica B (GrB) e linfotóxina alfa (LT- α) (MANSOURABADI *et al.*, 2023).

Os linfócitos B são responsáveis pelo reconhecimento de agentes infecciosos extracelulares, tais como fungos, bactérias e parasitas, o que se dá através do receptor de células B (BCR). O linfócito B reconhece o antígeno do agente infeccioso, seja ele fungo, bactéria ou parasita, internaliza-o, o processa endogenamente, tornando-se uma APCs que migrará para o linfonodo onde se iniciará o processo de formação da imunidade humoral. Após serem ativados, os linfócitos B passam por um processo de proliferação e diferenciação que leva à geração dos plasmócitos, responsáveis pela produção de anticorpos com alta afinidade para o antígeno que originou a resposta. São cinco as classes de imunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (CHAPLIN, 2010; CHEN *et al.*, 2021).

A IgA está presente na superfície mucosa e protege contra infecções bacterianas e virais. A IgA também tem um papel importante na neutralização de antígenos alimentares ajudando a manter a tolerância imunológica aos alimentos prevenindo, dessa forma, o desenvolvimento de alergia alimentar. A IgD está presente na superfície dos linfócitos B, participando da sua diferenciação; já no soro, sua concentração é muito baixa. A IgE desempenha seu papel na eliminação de parasitas extracelulares, como por exemplo helmintos, e tem um papel importante nas alergias. A IgG é a classe predominante e pode persistir no organismo por longos períodos, é encontrada em todos os fluidos corporais e protege contra infecções bacterianas e virais. A IgM é encontrada principalmente no sangue e no fluido linfático, é o primeiro anticorpo a ser

produzido pelo organismo para combater uma nova infecção (CHILDS; CALDER; MILES, 2019).

Os linfócitos B são inicialmente produzidos no saco vitelino, em seguida, no fígado fetal e, finalmente, na medula óssea. As células que irão se diferenciar em linfócitos B permanecem na medula óssea para maturação e os linfócitos B já maduros deixam a medula óssea e se direcionam para a circulação sanguínea e, posteriormente, migram para os órgãos linfoides secundários (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010).

Os linfócitos B são divididos em dois subtipos, B1 e B2, de acordo com a origem do seu desenvolvimento. Os linfócitos B1 possuem forte capacidade de auto renovação e são encontrados principalmente na cavidade pleural, peritoneal e em menor quantidade no baço. A principal função dos linfócitos B1 é a produção de grandes quantidades de anticorpos IgM que respondem a infecções bacterianas e a produção de IgA associada à defesa da mucosa contra parasitas (CASTAÑEDA-SÁNCHEZ *et al.*, 2017).

Os precursores de linfócitos B2 na medula óssea dão origem a linfócitos B da zona marginal (MZ-B) e linfócitos B da zona folicular (FC-B), conjuntamente denominados linfócitos B2. Essas populações de células são a maioria dos linfócitos B no hospedeiro e predominam em todos os tecidos linfoides. Os linfócitos B da zona marginal estão localizados na região periférica ou marginal do baço, região denominada sinusoide esplênico. Nessa região, podemos encontrar também os macrófagos da zona marginal que, juntamente com os linfócitos B da zona marginal, configuram a primeira linha de defesa rápida contra antígenos particulados que podem estar presentes na corrente sanguínea. Os linfócitos B da zona folicular estão localizados nos folículos linfoides e exercem sua função em um estágio mais avançado da resposta adquirida, gerando linfócitos B de memória e plasmócitos (KAER *et al.*, 2022).

Os linfócitos B têm uma característica diferencial, por terem a capacidade de desencadear uma resposta humoral T independente, por meio da qual podem responder fortemente a estímulos antigênicos e se diferenciar em células secretoras de anticorpos sem a necessidade de receber estímulos e auxílio dos linfócitos T. Além disso, esses linfócitos B compõem as respostas de memória natural, tendo em vista que possuem a capacidade de gerar rapidamente células efectoras nos estágios iniciais da resposta imune (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010).

2.3.3.Células NK

As células NK são os membros citotóxicos da família das células linfoides inatas. Elas são originárias da medula óssea, a partir de um progenitor comum aos linfócitos T. Contrariamente às outras células linfoides inatas, que são residentes nos tecidos, as células NK são células circulantes do sangue, constituindo de 5% a 20% das células mononucleares sanguíneas (CRUVINEL *et al.*, 2010; GUILLEREY, 2020).

As células NK, caracterizadas fenotipicamente pela expressão de CD56, fazem parte da imunidade inata, capaz de atacar rapidamente células infectadas. Essas células são importantes, pois reconhecem e lisam células infectadas por vírus, bactérias e protozoários, bem como células tumorais. Além disso, possuem a capacidade de recrutar neutrófilos e macrófagos, ativam células dendríticas e linfócitos T e B. A expansão e a ativação das células NK é ativada por IL-15 produzida por macrófagos. Após a sua ativação, as células NK lisam células infectadas e células tumorais, além de secretarem citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-2 e, principalmente, IFN- γ (CRUVINEL *et al.*, 2010).

As células NK, embora pertençam à imunidade inata, possuem características semelhantes às dos linfócitos T citotóxicos, tendo em vista que a eliminação de células infectadas e de células tumorais ocorre pela ação das enzimas perforinas e granzimas. As células NK interagem com as células-alvo, formando uma sinapse imunológica, pela qual esses grânulos são exocitados, levando à lise da célula-alvo (MORVAN; LANIER, 2016).

As células infectadas e as células tumorais apresentam baixa expressão das proteínas de MHC classe I, geralmente expresso na superfície de todas as células nucleadas, tornando-se assim susceptíveis à ação das células NK. A capacidade de eliminação das células tumorais é potencializada pela ação de IFN- γ , IL-2 e IL-12. As células NK exercem citotoxicidade natural contra células tumorais primárias e metastáticas, inibindo a proliferação, migração e colonização para tecidos distantes (WU *et al.*, 2020).

Além disso, as células NK expressam CD16, um receptor de superfície celular para a porção Fc altamente conservada da IgG. Quando a IgG se liga às células infectadas, esses anticorpos são reconhecidos pelo CD16 e desencadeiam a ativação das células NK e a morte das células alvo revestidas com a IgG. Este mecanismo é referido como citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (MORVAN; LANIER, 2016).

As células NK convencionais (cNK) são encontradas principalmente no sangue periférico e migram para um local específico para exercer suas funções. As células NK também incluem células NK residentes em tecidos (trNK). O processo de diferenciação dessas células é complexo e ocorre em diversos tecidos, como a medula óssea, fígado, timo, baço e nódulos linfáticos. Na medula óssea, sangue, baço e pulmões, as células NK são totalmente diferenciadas, enquanto as dos gânglios linfáticos e intestinos são imaturas e precursoras (WU *et al.*, 2020).

2.4. Determinação das subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo

Citometria se origina das palavras gregas *kytos*, que significa célula ou recipiente, e *metron*, que significa medida. Essencialmente, a citometria de fluxo refere-se à medição de células ou partículas em fluxo e é uma metodologia utilizada para o estudo morfológico, fenotípico e funcional de células, à medida que elas passam, em um meio líquido, por um feixe de luz/laser (ROBINSON *et al.*, 2023).

Uma das aplicações da citometria de fluxo é a imunofenotipagem, que utiliza anticorpos monoclonais especificamente produzidos contra os antígenos de diferenciação e, a partir do conhecimento prévio dos padrões normais de expressão antigênica das células nas suas diferentes fases maturativas, permite caracterizar o percentual de uma população de células normais ou identificar a presença de células anômalas (ROBINSON *et al.*, 2023).

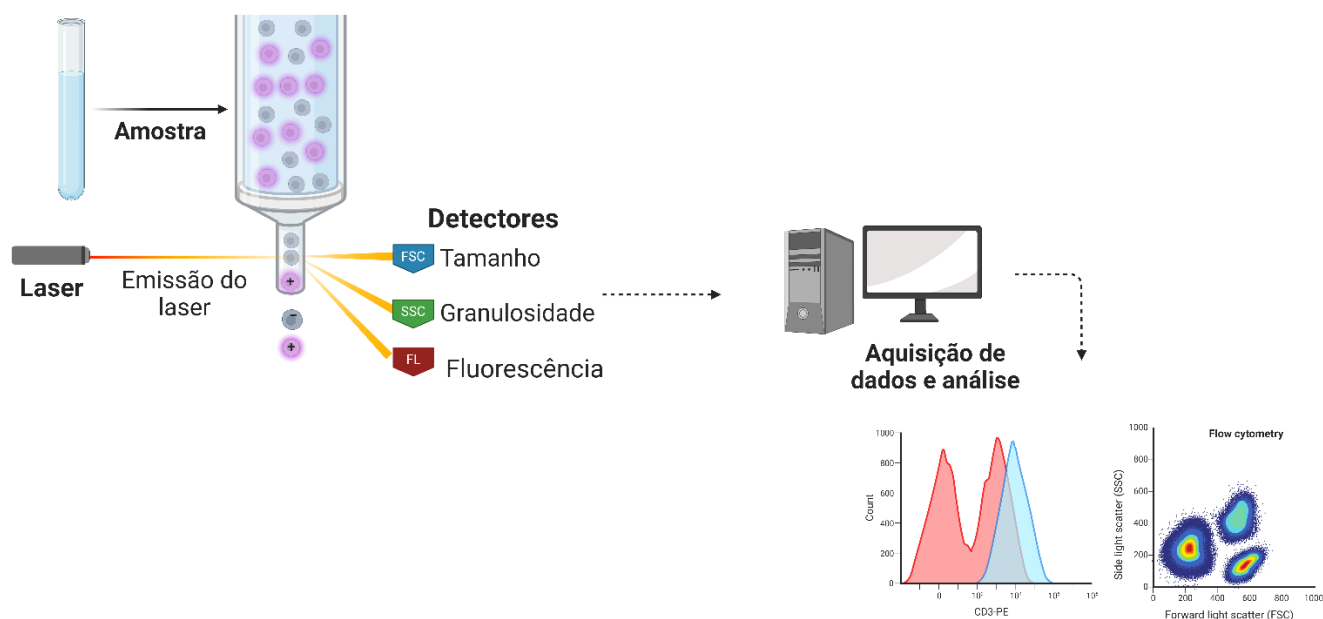
O funcionamento do citômetro de fluxo é resultado da integração de três sistemas: sistema de fluidos, sistema óptico e sistema eletrônico. O sistema de fluidos é responsável por conduzir as células em fluxo contínuo até serem interceptadas pelo laser. O tubo contendo a suspensão de células é acoplado ao citômetro de fluxo e as células são, aos poucos, aspiradas por um sistema de pressão e levadas a uma câmara especial denominada *flow cell* (célula de fluxo) (RUSSO *et al.*, 2010). Além de receber a suspensão de células, esta câmara é banhada por uma solução salina denominada *sheat fluid*, responsável por um fluxo contínuo, o qual, junto com o desenho cônico da câmara, organiza as células enfileiradas uma atrás da outra, de forma que, ao deixarem esta câmara por um pequeno orifício, sejam individualmente interceptadas pelo laser (SANTOS *et al.*, 2018).

O sistema óptico é formado por componentes de excitação (laser e lentes) e coleta (lentes, espelhos e fotodetectores). Quando a luz que incide sobre a célula é dispersa em ângulos pequenos, ela atinge o fotodetector posicionado frontalmente ao laser, o *Forward Scatter* (FSC), indicando o tamanho da célula. Quando a mesma luz é dispersa lateralmente, em ângulos maiores, ela atinge o fotodetector *Side Scatter* (SSC), que indica a granulosidade ou complexidade interna da célula. É importante ressaltar que a dispersão da luz é independente da fluorescência (BRESTOFF, 2023; MCKINNON, 2018).

Além do tamanho e da granulosidade, a metodologia também permite determinar o tipo celular de acordo com a expressão de marcadores de superfície ou intracelulares, através da imunofenotipagem, que consiste na marcação das células com anticorpos conjugados com fluorocromos excitáveis por lasers, o que leva à emissão de fluorescência (SANTOS *et al.*, 2018).

Uma vez que os sinais luminosos chegam aos detectores, ou fotomultiplicadores, são convertidos em sinais eletrônicos que podem ser processados pelos computadores (Figura 2) (DE FIGUEIREDO *et al.*, 2022).

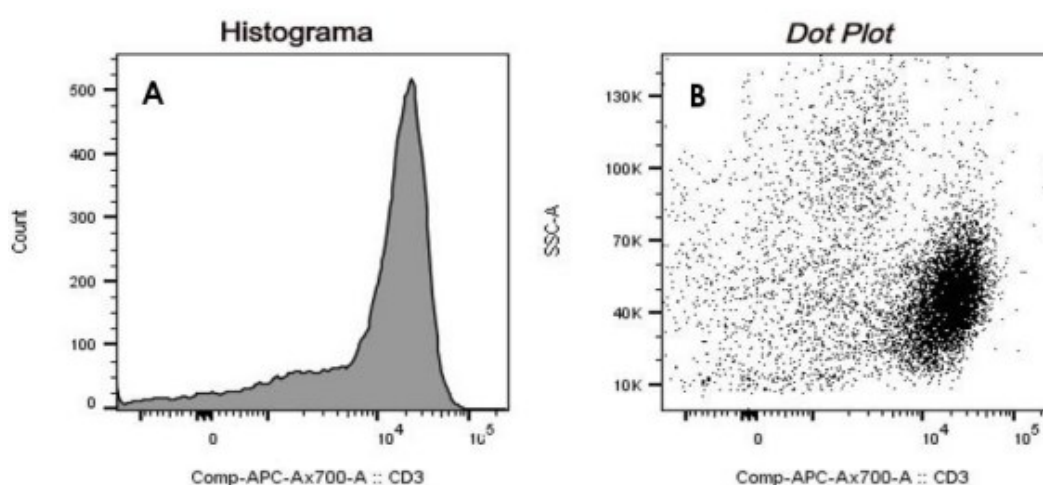
Figura 2. Representação esquemática do funcionamento do citômetro de fluxo



Fonte: Adaptado de DE FIGUEIREDO *et al.*, 2022

Os dados obtidos são interpretados pelo sistema eletrônico e convertidos, através de software que é específico para cada tipo de citômetro de fluxo, em histogramas e/ou gráficos de pontos denominados *dot plots*. Os histogramas são gráficos monoparamétricos que permitem observar as variações no eixo X e o número de eventos no eixo Y. Já os *dot plots* são biparamétricos e representam a distribuição total dos eventos capturados, considerando que cada ponto do gráfico representa um evento avaliado (Figura 3) (FLORES-GONZALEZ; CANCINO-DÍAZ; CHAVEZ-GALAN, 2020).

Figura 3. Gráficos do tipo histograma e Dot plot gerados na citometria de fluxo

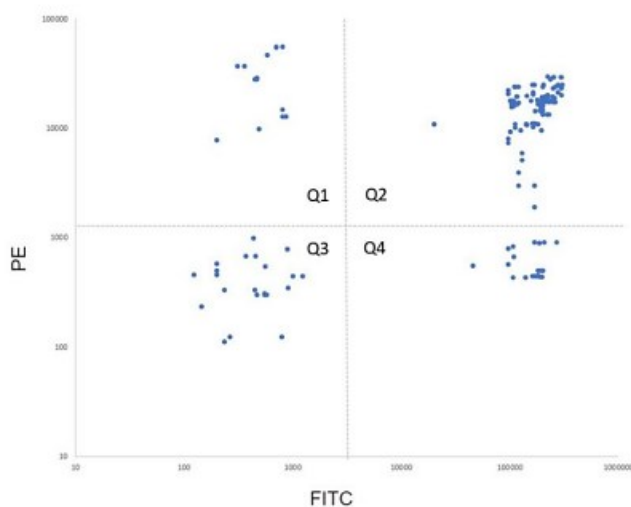


Fonte: COSTA, 2022

As análises em citometria de fluxo se baseiam, primariamente, na identificação das características físicas das células, isto é, tamanho e granulosidade. A partir desses dados, é gerado um gráfico *dot plot*, selecionando para os eixos X e Y os parâmetros de tamanho e granulosidade, respectivamente, em escala linear (COSTA, 2022).

Após a avaliação de tamanho e granulosidade, outros gráficos gerados pelo equipamento permitem avaliar a intensidade da fluorescência dos fluorocromos utilizados na amostra, tanto individualmente (histograma), quanto simultaneamente (*dot plot*). Os gráficos do tipo *dot plot* são divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3, Q4), geralmente utilizando a escala logarítmica (Figura 4) (SANTOS *et al.*, 2018).

Figura 4. Gráfico Dot plot gerado na citometria de fluxo com divisão em quadrantes

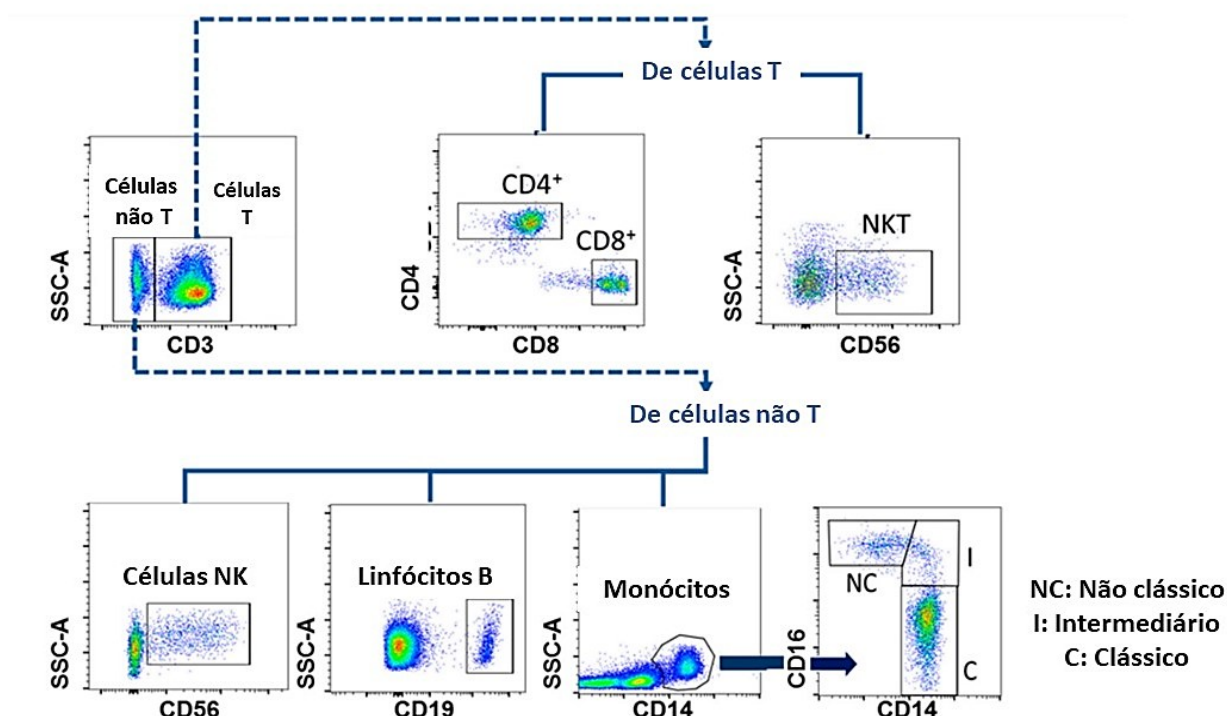


Fonte: COSTA, 2022

A intensidade de fluorescência representada no Q1 é referente às células marcadas com o fluorocromo PE; o Q2 representa a intensidade de fluorescência das células marcadas com o fluorocromo PE e com o fluorocromo FITC; as células negativas para ambos os fluorocromos PE e FITC são representadas no Q3; e finalmente, o Q4 representa a intensidade de fluorescência das células positivas para o fluorocromo FITC.

Através dos softwares, ainda é possível fazer a seleção de regiões específicas, chamadas de *gates*, o que permite selecionar as populações celulares que se deseja avaliar. Após selecionar um *gate*, é possível avaliar intensidade de fluorescência somente das células situadas nesta região (Figura 5). Dessa, forma é possível determinar o percentual de células em cada quadrante ou *gate*, representado em números (SANTOS *et al.*, 2018).

Figura 5. Seleção de regiões específicas (gates) na citometria de fluxo



Fonte: Adaptado de FLORES-GONZALEZ; CANCINO-DÍAZ; CHAVEZ-GALAN, 2020

A utilização da citometria de fluxo, como qualquer outro teste laboratorial, requer a adoção de medidas para controle da qualidade ao longo de todo o processo. Na fase pré-analítica, devem ser observadas características como origem da amostra (sangue periférico, medula óssea, culturas celulares); quantidade necessária de amostra; tipo de anticoagulante que não interfira na análise da amostra (ácido etilenodiamino tetra-acético-EDTA, heparina); tempo adequado entre a obtenção da amostra e sua análise e, por fim, condições de transporte e preservação da amostra. Na fase analítica, são estabelecidas as características para otimizar e reproduzir o ensaio através de controles que garantam a reprodutibilidade dos resultados. Por fim, na fase pós-analítica deve-se estabelecer a representação adequada dos resultados, para identificar populações de células, permitindo a elaboração de relatórios com interpretação simples e prática para os profissionais (ABRAHAM; AUBERT, 2016; FLORES-GONZALEZ; CANCINO-DÍAZ; CHAVEZ-GALAN, 2020).

2.5. Intervalo de referência de linfócitos

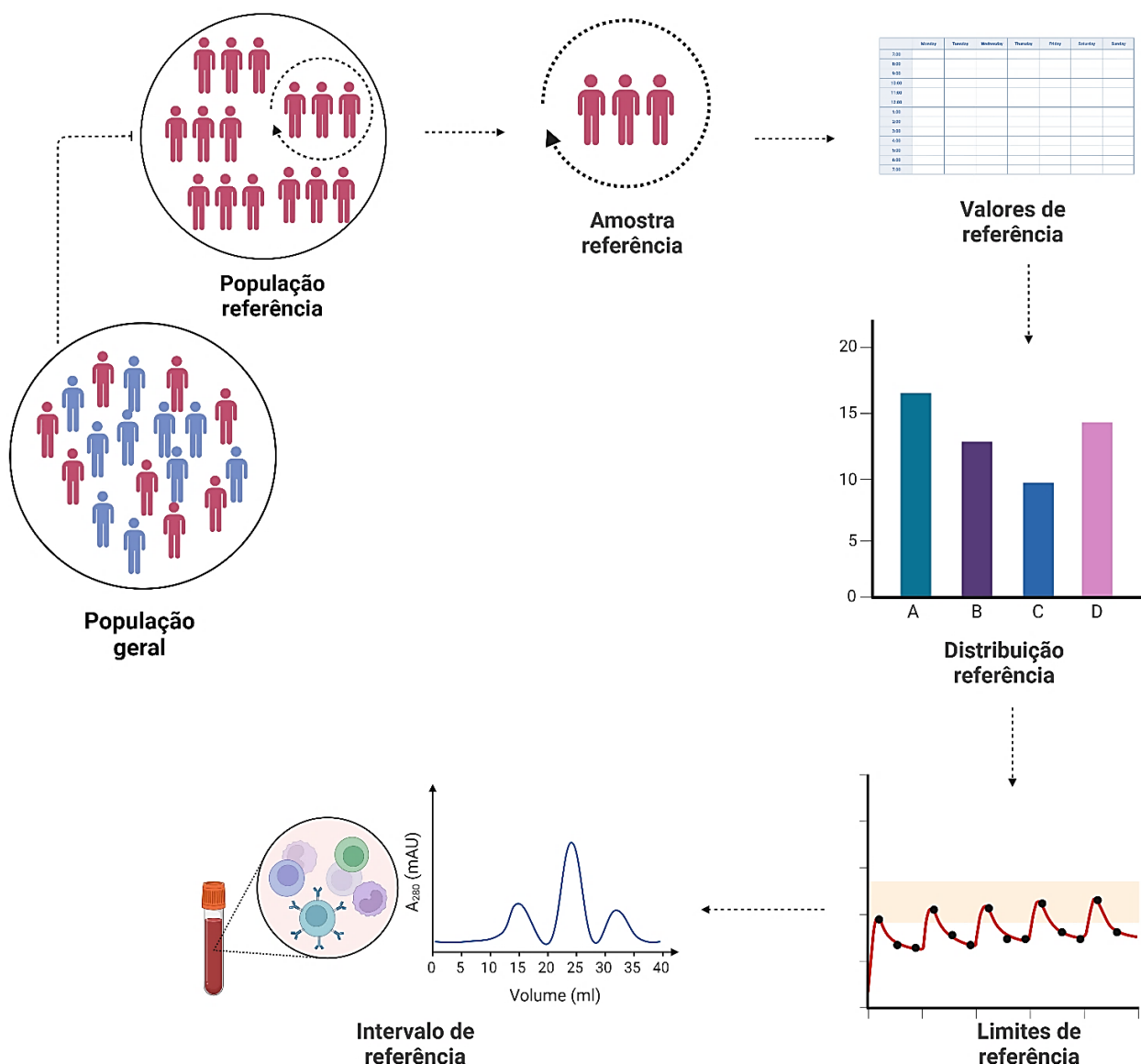
A definição de IR auxilia os profissionais de saúde na interpretação dos resultados visando o diagnóstico, prognóstico e tratamento de doenças (WANG *et al.*, 2022). Entretanto, o IR adotado pelos laboratórios normalmente são fornecidos pelos fabricantes, sendo importante a prática de se estabelecer IR próprios, e de se observar e verificar a aplicabilidade para a população avaliada (COSKUN *et al.*, 2022; HOROWITZ, 2008). Contudo, estabelecer IR em algumas situações pode ser um grande desafio, tendo em vista a necessidade de seleção de uma amostra dos indivíduos saudáveis (população de referência) representativa da população como um todo (amostra de referência), a padronização dos cuidados na coleta, transporte, análises e a avaliação estatística. Sendo assim, determinar IR não é uma prática comum, sendo mais frequente em países que conduzem estudos populacionais (SÁ *et al.*, 2023).

Os IR podem sofrer influência de fatores individuais, populacionais e ambientais, podem variar com a idade, sexo, raça, nível socioeconômico, dieta, atividade física, estresse, tabagismo, uso de medicações e bebidas alcoólicas, presença de fatores de risco, estado fisiológico, geografia, exposição a agentes químicos, físicos e biológicos. Estes fatores devem ser reconhecidos ao se estabelecer IR para a população em que serão aplicados, pois refletem a real condição de saúde (FARRELL; NGUYEN, 2019; ROSENFELD *et al.*, 2019; MORAES-PINTO *et al.*, 2014).

Recomendações com os critérios para obtenção do IR, como definição da população de referência, padronização das fases pré-analítica e analítica, e análise estatística dos dados são propostas pela *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) e pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2008).

De acordo com essas recomendações, a população de referência na qual se baseia o estudo deve ser apropriadamente selecionada, segundo critérios como sexo, idade, presença de fatores de risco (obesidade, hipertensão, diabetes etc.), estados fisiológicos específicos (gravidez, exercício físico, stress), uso de drogas e outros fatores (raça, nível socioeconômico). Para se estabelecer o IR, após a coleta e a análise padronizada das amostras dos indivíduos de referência, os valores encontrados são avaliados em relação à sua distribuição e identificados os limites inferior e superior para o analito específico, geralmente utilizando os percentis 2,5 e 97,5, para produzir um IR central de 95% (Figura 6) (DOYLE; BUNCH, 2023).

Figura 6. Representação esquemática das etapas para determinação de IR



Fonte: Adaptado de AYTEKIN; EMERK, 2008.

Uma vez identificados os indivíduos de referência, é importante que os fatores pré-analíticos sejam controlados cuidadosamente. Alguns fatores devem ser observados e padronizados, de acordo com as características de cada teste, como: tempo de jejum, atividade física, uso de medicação; horário da coleta, tempo de garroteamento, tipo de tubo e anticoagulante utilizado; e manuseio da amostra quanto ao tempo de coagulação, centrifugação e armazenamento (HOROWITZ, 2008). Além disso, as características do método analítico devem ser descritas em detalhes, devendo ser estabelecidas sua precisão e exatidão e definidos os limites de detecção, linearidade e interferentes (DOYLE; BUNCH, 2023).

Mesmo sendo reconhecida a importância de se determinar IR próprio da população, para a maioria dos testes os IR utilizados são obtidos em outras populações. No Brasil, encontramos algumas iniciativas relacionadas à definição de IR próprios, como o estudo para definição de IR para os parâmetros do hemograma em adultos brasileiros com dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), que realiza a coleta de sangue e urina e que tem, como um dos objetivos, definir alguns valores de referência da população adulta brasileira. Entretanto, os dados da PNS não incluem IR para subpopulações de linfócitos, por se tratar de exames que não fazem parte da rotina e que necessitam de técnicas mais caras e restritas como a citometria de fluxo (ROSENFELD *et al.*, 2019; SÁ *et al.*, 2023).

Definir IR específicos de subpopulações de linfócitos da população brasileira pode fornecer informações importantes, que permitam a interpretação mais fidedigna e adequada dos resultados em inúmeras situações clínicas, incluindo imunodeficiências primárias ou congênitas e as imunodeficiências secundárias ou adquiridas, incluindo a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (KOKUINA *et al.*, 2019). Ademais, determinar IR específicos para a nossa população é especialmente importante, considerando que se caracteriza pela miscigenação de uma diversidade de raças, etnias, povos, segmentos sociais e econômicos (ROSENFELD *et al.*, 2019; NUNES *et al.*, 2025).

Diferentes estudos sugerem que as variações nas contagens das subpopulações de linfócitos podem depender de alguns fatores como tabagismo, nutrição, ambiente, sexo, idade, fatores genéticos, localização geográfica e até do estado emocional (AL-MAWALI *et al.*, 2013; AL-THANI *et al.*, 2015; EL ALLAM *et al.*, 2021; RUDOLF-OLIVEIRA *et al.*, 2015; SHAHAL-ZIMRA *et al.*, 2016; WONG *et al.*, 2013; MORAES-PINTO *et al.*, 2006).

2.6. Uso clínico das subpopulações de linfócitos

A quantificação de subpopulações de linfócitos é necessária em diferentes condições clínicas, tanto para estabelecer o diagnóstico, quanto como critério de progressão da doença ou para a otimização do tratamento (GARCIA-PRAT *et al.*, 2019).

Nas imunodeficiências primárias, algumas subpopulações de linfócitos podem estar ausentes ou reduzidas. A gamaglobulinemia ligada ao X (XLA) caracteriza-se pela ausência de linfócitos B no sangue periférico; já a síndrome de hiper IgE autossômica dominante (HIES) e

a candidíase mucocutânea crônica (CMCD) apresentam diminuição do número de linfócitos T produtoras de IL-17. Já a imunodeficiência combinada severa (SCID) é um distúrbio geneticamente heterogêneo caracterizado por uma diminuição importante (<300 linfócitos/ μL) ou ausência de linfócitos T, que pode ser acompanhada por uma ausência ou diminuição nos linfócitos B e células NK (KANEGANE *et al.*, 2018; KNIGHT, 2019; MA; TANGYE, 2019; TAKASHIMA *et al.*, 2017).

Nas imunodeficiências secundárias, como na infecção pelo HIV, doenças autoimunes, algumas infecções ou câncer, alterações nas subpopulações de linfócitos são encontradas. Uma importante aplicação da quantificação de subconjuntos de linfócitos T é o acompanhamento do tratamento da infecção pelo HIV, em que a quantificação de subpopulações de linfócitos permite monitorizar a taxa de linfócitos T e o seu restabelecimento durante o tratamento (FORD *et al.*, 2017; KOKUINA *et al.*, 2019; LOUATI *et al.*, 2019).

Mais recentemente, a contagem de linfócitos apresentou importante potencial prognóstico da infecção pelo novo coronavírus (*Coronavirus Disease – COVID-19*). Foi demonstrada a redução de linfócitos totais, bem como a redução de linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, linfócitos B e células NK em pacientes com COVID-19. Os pacientes com casos graves tinham linfócitos totais, linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B significativamente mais baixos em comparação com pacientes com casos leves (HUANG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). Esse potencial de prognóstico foi reforçado ao se observar uma tendência de níveis acentuadamente mais altos de citocinas inflamatórias, bem como níveis mais baixos de subpopulações de linfócitos em pacientes que faleceram por COVID-19 em comparação com os sobreviventes (JIANG *et al.*, 2021).

Outras situações promissoras em que a quantificação das subpopulações de linfócitos poderia ser útil seria como preditor de prognóstico nos quadros de sepse, com redução de linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos, demonstrado em modelos animais (SHARMA *et al.*, 2015). A contagem de células T no sangue periférico também foi utilizada como ferramenta para prever a eficácia terapêutica no linfoma difuso de grandes células B ao tratamento com células T com receptores antigênicos quiméricos (CAR-T) demonstrando ser um marcador clinicamente útil para avaliar o potencial de atividade das células (WADA *et al.*, 2022).

Em relação as doenças crônicas, são observadas diferenças na contagem das subpopulações de linfócitos entre pacientes com diabetes resistente à insulina grave, diabetes leve relacionado à obesidade e diabetes autoimune grave (RATTER-RIECK *et al.*, 2021). Ainda, em pacientes com mieloma múltiplo, linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos foram utilizados como preditores prognósticos (GU *et al.*, 2020).

2.7. Fatores que influenciam as subpopulações de linfócitos

Evidências disponíveis sugerem que vários fatores influenciam as subpopulações de linfócitos, tais como idade, sexo, raça, nível socioeconômico, múltiplos fatores psicológicos, geografia, ritmos circadianos, exposição a agentes químicos, físicos e biológicos e fatores genéticos. Os hábitos de vida como tabagismo, ingestão de álcool, atividade física, obesidade, dieta e qualidade do sono, uso de medicamentos, também podem afetar as subpopulações de linfócitos e seus efeitos podem ser duradouros sobre o sistema imune (FARRELL; NGUYEN, 2019; GARCÍA-DABRIO *et al.*, 2012; ROSENFELD *et al.*, 2019; SWABY *et al.*, 2023; TOSATO *et al.*, 2013).

2.7.1. Idade

As mudanças relacionadas à idade no sistema imunológico foram definidas como imunossenescência, em que algumas respostas imunológicas são diminuídas, deixando outras inalteradas ou aumentadas. O processo de imunossenescência consequentemente reflete uma diminuição da resposta imune frente a infecções virais e bacterianas, resposta deficiente à vacinação e o aumento do risco de doenças autoimunes (LIGOTTI *et al.*, 2021).

Uma das características mais acentuadas da imunossenescência é a diminuição de linfócitos T auxiliar e linfócitos T citotóxicos virgens, bem como a diminuição de sua diferenciação em células de memória. Esse fenômeno pode ser explicado pela sucessão de eventos como a involução tímica, que impacta significativamente o envelhecimento celular ao reduzir o número de linfócitos T virgens e estreitar a diversidade do receptor de célula T, o que contribui para um sistema imunológico enfraquecido e exausto. A diminuição relacionada à idade em células T virgens pode explicar parcialmente a capacidade reduzida de responder a

novos antígenos e a maior suscetibilidade a câncer na pessoa idosa (CHANG *et al.*, 2024; KUMAR; CONNORS; FARBER, 2018; FARIA *et al.*, 2008).

Outra característica marcante da imunossenescência é o *inflammaging*, que se refere a um estado sistêmico de inflamação crônica de baixo grau, caracterizado por marcadores inflamatórios sanguíneos regulados positivamente e é considerado o pilar central do envelhecimento. À medida que o sistema imunológico envelhece, o metabolismo sofre alterações que envolvem aumento da glicólise, disfunção mitocondrial e o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas características da imunossenescência estão fortemente relacionadas à alta morbidade e mortalidade por doenças associadas à idade, como doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes, doenças metabólicas e cânceres (LIU *et al.*, 2023).

2.7.2. Sexo

O sexo é outro fator não modificável que também exerce influência sobre o sistema imune. As diferenças de sexo nas respostas imunes estão associadas a dois fatores principais: a influência dos hormônios sexuais, como testosterona e estrogênio, e a diferença no número de genes relacionados ao sistema imunológico no cromossomo X (FRITZ GARCÍA; KELLER VALSECCHI; BASILICATA, 2024).

Estrogênios, progesterona e andrógenos (testosterona) são os hormônios sexuais gonadais predominantes. Os receptores de estrogênio (ER- α e ER- β), receptor de progesterona (PR) e receptor de andrógeno (AR) são expressos por uma variedade de células imunes (linfócitos T, linfócitos B, células dendríticas, monócitos e macrófagos, células NK, células linfoides e granulócitos). Os andrógenos impactam as respostas imunes adaptativas e podem inibir as respostas imunes humorais e celulares, reduzindo a proliferação de linfócitos T e linfócitos B e diminuindo a produção de imunoglobulinas e citocinas. Sobre os linfócitos B, os andrógenos têm efeitos inibitórios na linfopoiese e afetam especificamente a produção de precursores de linfócitos B, que expressam AR. Já o estrogênio tem efeitos imunoestimulatórios no sistema imune adaptativo, incluindo um aumento linfócitos B, embora também aumente o número e a função de linfócitos T reguladores (FORSYTH *et al.*, 2024; LAI *et al.*, 2012).

O cromossomo X contém cerca de 50 genes relacionados ao sistema imunológico, incluindo alguns importantes para a identidade da célula imune (*FOXP3*), ativação celular e sinalização intracelular (*CD40LG*, *TLR7*, *IRAK1*, *IL13RA1/2*, *NEMO*, *TASL*, *IL-9R*), tráfico de leucócitos (*CD99*, *CXCR3*), diferenciação e proliferação de células imunes (*IL-2RG*, *BTK*) e metabolismo celular (*OGT*, *CYBB*). Assim, o cromossomo X é provavelmente um importante fator que reforça a base molecular da resposta imune distinta entre os sexos (FORSYTH *et al.*, 2024).

2.7.3.Obesidade

O tecido adiposo é um órgão endócrino que contém vários tipos de células, como, adipócitos, fibroblastos, células endoteliais vasculares e células imunes. A obesidade gera hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, liberação de ácidos graxos e ativação das células do sistema imune tanto inato quanto adaptativo, gerando diversos estímulos pró-inflamatórios, dentre eles a secreção de citocinas inflamatórias. O aumento da secreção de citocinas produzidas pelos adipócitos, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, leptina e resistina, com a redução paralela de IL-10 e adiponectina, caracterizam a obesidade como um estado inflamatório de baixa intensidade ou de baixo grau (ELLULU *et al.*, 2017; RIVERA-CARRANZA *et al.*, 2023).

Esse processo atua como um feedback positivo recrutando linfócitos T auxiliares, T citotóxicos e células NK, e levando também à redução proporcional das células T reguladoras. Esse cenário contribui para a produção de mais citocinas pró-inflamatórias, a liberação de quimiocinas, e cria um ciclo de recrutamento celular contínuo com inflamação constante, fomentando o estado inflamatório da obesidade (ANDERSEN; MURPHY; FERNANDEZ, 2016; SCHLEH *et al.*, 2023).

Essa inflamação de baixo grau presente na obesidade afeta tecidos metabolicamente importantes, além do tecido adiposo, como o fígado, músculo esquelético, ilhotas pancreáticas e cérebro. Além disso, também contribui para o desenvolvimento de doenças crônicas como síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, doença cardiovascular, doença articular, esteatose hepática, entre outras (ALHARBI *et al.*, 2023; RIVERA-CARRANZA *et al.*, 2023). Estudos indicam que ter um peso corporal adequado está

associado a uma boa aptidão imunológica, já uma pior resposta imunológica se correlaciona significativamente com obesidade, distúrbios do sono e tabagismo (ALHARBI *et al.*, 2023; KIANI *et al.*, 2022).

2.7.4.Tabagismo

A fumaça do cigarro contém mais de 7.000 compostos químicos diferentes e promove a inflamação por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e fator estimulador das colônias de granulócitos-macrófagos e do acúmulo de células imunológicas nas vias respiratórias (STRZELAK *et al.*, 2018). Os efeitos imunológicos do tabagismo variam de acordo com a duração do hábito de fumar, sendo os efeitos notavelmente mais evidentes nos linfócitos T auxiliares e citotóxicos e células NK (MUKHARJEE; BANK; MAITI, 2020).

O tabagismo altera especificamente genes vitais de regulação imunológica em subpopulações de linfócitos, especialmente os linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos e macrófagos (NOWAK *et al.*, 2022). Além disso, o tabagismo a longo prazo exerce efeito supressor nas células NK e pode levar a diminuição da concentração sérica de imunoglobulinas e lisozima, especialmente em homens que fumam há mais de 10 anos; a diminuição do número absoluto de células NK e o número elevado de linfócitos T citotóxicos impacta na diminuição da relação linfócito T auxiliar/linfócito T citotóxico (ANDERSSON *et al.*, 2016; MOSZCZYŃSKI *et al.*, 2001).

A fumaça do cigarro é uma importante fonte de ROS e de espécies reativas de nitrogênio (RNS). Estudos de Hasnis e colaboradores demonstraram que a exposição leve à fumaça do cigarro também induziu NF-kappaB nos linfócitos, através do aumento do estresse oxidativo e da redução dos níveis de glutathione intracelular. Estas descobertas podem ter implicações tanto para os fumantes ativos como para os fumantes passivos (HASNIS *et al.*, 2007a, b).

2.7.5. Uso de álcool

Depois do tabaco, o álcool é a substância de uso lícito mais consumida no Brasil. Estima-se que o consumo anual de álcool puro per capita seja de 8,7 litros por adulto, acima da média mundial de 6,2 litros (TORRES *et al.*, 2022).

O álcool pode modular a atividade das células do sistema imune, interferindo nas respostas imunológicas essenciais, mas os efeitos específicos nas respostas das células dependem do padrão de exposição ao álcool. A exposição ao álcool pode interferir em vários aspectos da resposta imune adaptativa, incluindo a apresentação de antígenos necessária para ativação dos linfócitos T, linfócitos B, bem como a funcionalidade dessas células (MOLINA *et al.*, 2010; SZABO; SAHA, 2015).

A exposição aguda ao álcool pode e inibir a função das células apresentadoras de antígenos, o que aumenta a suscetibilidade a infecções quando o consumo agudo de álcool coincide com a exposição a patógenos. O desequilíbrio entre linfócitos T auxiliar e linfócitos T citotóxicos virgens e de memória também foi relatado, resultando em uma mudança em direção a um fenótipo de memória (SHALCHI-AMIRKHIZ *et al.*, 2023; SZABO *et al.*, 2004).

A exposição crônica ao álcool pode levar a linfopenia, aumento da diferenciação e ativação dos linfócitos T, redução da sua migração e alteração na sua capacidade de se expandir e responder a patógenos, podendo produzir um estado de falta de resposta, ou anergia. Essas mudanças, por sua vez, comprometem a capacidade do organismo de responder a antígenos, o que pode contribuir para o aumento da suscetibilidade a infecções (PASALA; BARR; MESSAOUDI, 2015; SZABO; MANDREKAR, 2009).

Os defeitos induzidos pelo álcool na função das células dendríticas incluem níveis reduzidos de CD80 e CD86 na superfície das células, essenciais para induzir a ativação dos linfócitos T, bem como a produção reduzida de IL-12, que é crítica para estimular os linfócitos T auxiliares virgens a se diferenciarem para um perfil Th1 produtoras de IFN- γ (MOLINA *et al.*, 2010).

Nos linfócitos B, a exposição ao álcool parece produzir uma diminuição na contagem dessas células, mediada principalmente por uma diminuição de linfócitos B convencionais (B2), o que pode influenciar na capacidade de responder a novos antígenos (ABSHIRE *et al.*, 2025; MOLINA *et al.*, 2010; PASALA; BARR; MESSAOUDI, 2015).

As células NK são quantitativa e qualitativamente alteradas pelo abuso de álcool, que interfere na expressão de várias proteínas das células NK, como por exemplo nas perforinas e granzimas, e essa inibição leva a uma diminuição na capacidade das células NK de destruir células infectadas. Esse comprometimento na atividade das células NK pode afetar a imunovigilância e desempenhar um papel no desenvolvimento de tumores e infecções virais (MOLINA *et al.*, 2010).

Por fim, é possível observar que independentemente do nível de exposição ao álcool, seja agudo ou crônico, há os efeitos imunomoduladores em ambos os braços do sistema imunológico (AZIZOV; ZAISS, 2021).

2.7.6. Atividade física

O exercício físico é um fator essencial na liberação e controle de células, citocinas e interleucinas do sistema imunológico, uma vez que proporciona alterações neurofisiológicas no organismo, afetando assim todas as partes do corpo humano. É bem conhecido que a atividade física pode afetar o sistema imunológico, no entanto, alguns fatores devem ser levados em consideração como o tipo de exercício, sua intensidade, duração e periodicidade (BIZUTI *et al.*, 2022).

Exercícios de curta duração e de intensidade moderada realizados pelo menos três vezes por semana afetam positivamente o sistema imunológico, pois aumentam a função leucocitária, aumentam a quimiotaxia, a degranulação, a atividade citotóxica, a fagocitose e a atividade oxidativa de neutrófilos e macrófagos e aumentam a atividade citotóxica de linfócitos T citotóxicos e das células NK e a proliferação de linfócitos B. Além disso, há redução nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6, TNF- α e IL-1 β . O exercício moderado associado ao treinamento de resistência aeróbica favorece o aumento da fagocitose de macrófagos, linfócitos T auxiliares e aumento de citocinas anti-inflamatórias tais como IL-4 e IL-10 (BIZUTI *et al.*, 2022).

A atividade física tende a mobilizar os leucócitos com características de migração e de função efetora rápida, como os linfócitos T citotóxicos, células NK e neutrófilos. Essa redistribuição de células durante a atividade física está relacionada ao aumento da vigilância imunológica. Os efeitos imunoestimulantes da prática da atividade física podem ser atribuídos

à mobilização de células, melhora da sua capacidade de migração e melhora da função citotóxica e da capacidade de reconhecer antígenos (DAMIOT *et al.*, 2020; GUSTAFSON *et al.*, 2021; PITANGA *et al.*, 2022).

A contribuição da atividade física para o sistema imunológico inclui imuno vigilância e melhora da competência imunológica que auxiliam no controle de patógenos. Além disso, a redução do sobrepeso, aumento do condicionamento físico e cardiopulmonar, atenuação dos estados pró-inflamatórios e pró-trombóticos sistêmicos, diminuição do estresse oxidativo, melhora dos metabolismos glicêmico, insulínico e lipídico e a melhora da resposta vacinal, também indicam o quanto a atividade física pode ser benéfica para a resposta imunológica (DA SILVEIRA *et al.*, 2021).

2.7.7.Diabetes mellitus

A hiperglicemia exerce influência no sistema imunológico, particularmente afetando a dinâmica dos linfócitos T. O diabetes mellitus tipo 2 representa um distúrbio metabólico complexo caracterizado por hiperglicemia relacionada a resistência à insulina e/ou deficiência de insulina, e envolve inflamação crônica de baixo grau, desequilíbrio no sistema imunológico e frequentemente associada a obesidade e síndrome metabólica. A combinação entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias desempenha um papel crucial neste contexto, afetando a sinalização da insulina e a progressão do diabetes. Cada vez mais, em vez de examinar apenas o papel da função imunológica alterada na causa da doença, os estudos começaram a se concentrar nos reflexos do diabetes sobre o sistema imunológico (DAOUD *et al.*, 2009).

Tem sido demonstrado que indivíduos com diabetes passam por inúmeras alterações no seu sistema imunológico, sendo mais pronunciado o aumento de células Th17 e uma maior proporção de células Th17/células T reguladoras. Além disso, é demonstrado um aumento da expressão de gene pró-inflamatório (IL17A e RORC), citocinas pró-inflamatórias como IFN γ e IL-1 β e de marcadores de ativação de linfócitos T como CD44 e CD69, indicando uma resposta inflamatória sistêmica que contribui para a resistência à insulina e progressão do diabetes. Esse estado pró-inflamatório também está relacionado com complicações do diabetes como por exemplo a nefropatia (LEE *et al.*, 2024).

O sistema imunológico não é afetado apenas pela hiperglicemia, mas também pela acidose ou cetose que surgem com a progressão do diabetes. Essas condições podem levar a redução de linfócitos T auxiliares, redução de citotoxicidade das células NK, e redução de aspectos funcionais como quimiotaxia e fagocitose (DAOUD *et al.*, 2009).

Estudos sugerem uma ligação entre a obesidade, diabetes e sistema imune, uma vez que o estado crônico de inflamação sistêmica de baixo grau presente na obesidade é responsável pela produção excessiva de mediadores inflamatórios no tecido adiposo. Uma vez liberadas, essas citocinas pró-inflamatórias interferem na sinalização da insulina em tecidos responsivos à insulina como o fígado e o músculo esquelético, isso leva à resistência à insulina e, finalmente, à hiperglicemia por exaustão da capacidade adaptativa das células β pancreáticas (XU *et al.*, 2025).

Sugere-se que os adipócitos e os macrófagos sejam fontes primárias de mediadores pró-inflamatórios no diabetes tipo 2 e são considerados o ponto central na patogênese da doença. Há o envolvimento das subpopulações de linfócitos nesse mecanismo, dentre elas as subpopulações inatas como por exemplo os linfócitos T $\gamma\delta$ e células NK e das subpopulações adaptativas como por exemplo os linfócitos T auxiliar, linfócitos T citotóxicos, e linfócitos T reguladores (BAILIN *et al.*, 2020; OLSON *et al.*, 2015).

2.7.8.Hipertensão

Resposta imune inata e adaptativa participam dos mecanismos que contribuem para a inflamação na hipertensão. Existe uma relação positiva do aumento da contagem de linfócitos, monócitos e neutrófilos com a pressão arterial sistólica e diastólica (SIEDLINSKI *et al.*, 2020).

Na elevação da pressão arterial, são produzidos antígenos que contribuem para a ativação de linfócitos de perfil Th1 que participam de mecanismos de doença cardiovascular, em parte mediando os efeitos da angiotensina II e mineralocorticoides. Uma vez ativados, os linfócitos de perfil Th1 podem contribuir para a elevação da pressão arterial afetando o rim e a remodelação vascular dos vasos sanguíneos diretamente por meio dos efeitos das citocinas por eles produzidos (SCHIFFRIN, 2014; SIEDLINSKI *et al.*, 2020).

Por outro lado, foi demonstrado que os linfócitos T reguladores parecem desempenhar um papel protetor, sendo capazes de proteger órgãos alvos contra o desenvolvimento de danos oriundos da hipertensão, incluindo alterações micro e macrovasculares (DE CIUCEIS *et al.*, 2014; GUZIK *et al.*, 2024; MCMASTER *et al.*, 2015; MIKOLAJCZYK; GUZIK, 2019).

No mesmo sentido, Alexander e colaboradores observaram uma diminuição de células T reguladoras circulantes na hipertensão, reforçando que reduções nas populações de linfócitos T de perfil anti-inflamatórias podem contribuir para o aumento e manutenção da inflamação, sinalizando dessa forma que a resolução inadequada da inflamação pode contribuir para a inflamação crônica na hipertensão (ALEXANDER *et al.*, 2023).

2.8. Subpopulações de linfócitos na depressão e ansiedade

A saúde mental representa um componente importante do estado geral de saúde e, nas últimas décadas, uma quantidade crescente de pesquisas demonstram uma associação entre transtornos mentais frequentes, como ansiedade e depressão, com doenças crônicas e o sistema imune. A depressão e a ansiedade estão relacionadas a doenças crônicas como doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, diabetes e câncer, compartilhando mecanismos sociais e psicológicos envolvidos, bem como a desregulação dos sistemas nervoso e imunológico (CEN *et al.*, 2024; HOFFMANN *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2021).

O sistema imunológico desempenha um papel importante na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos, envolvendo entre outras alterações das células imunes, aumento de e citocinas inflamatórias e ROS. Alguns estudos sugerem envolvimento de resposta imuno-inflamatória, bem como neuroinflamação nos processos fisiopatológicos de transtornos mentais, como depressão e ansiedade (LIU *et al.*, 2022; MILANESCHI *et al.*, 2021; MILLER; RAISON, 2016).

Vários ensaios clínicos demonstraram ativação generalizada da resposta inflamatória imune em grupos de pacientes com transtornos depressivos. Pacientes com depressão maior frequentemente apresentam aumento de marcadores inflamatórios, como proteína C-reativa (PCR) e citocinas inflamatórias como IL-6 e IFN- γ (LAMERS *et al.*, 2019; MILANESCHI *et al.*, 2021; MILLER; RAISON, 2016; OBERMANN *et al.*, 2021). Estudos de meta-análises

mostraram que os antidepressivos reduzem os níveis de algumas citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 no sangue periférico (CUI *et al.*, 2023; JIANG *et al.*, 2023; MIN *et al.*, 2023).

A ativação crônica da resposta imune celular pode alterar os níveis de serotonina e dopamina, levando a sintomas como anedonia, fadiga e distúrbios do sono. Além disso, em transtornos como esquizofrenia e transtorno bipolar, observa-se um desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como uma ativação anômala de linfócitos T (GIALLUISI *et al.*, 2020; MILLER; RAISON, 2016).

Os transtornos mentais também podem ser acompanhados por uma imunossupressão (BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020). Diferentes estudos mostraram diminuição da função linfocitária na depressão, sugerindo um comprometimento da imunidade mediada por células (BALDERAS-VAZQUEZ *et al.*, 2022; BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020; KRONFOL *et al.*, 1983; SYED *et al.*, 2018).

Na ansiedade fatores genéticos, estilo de vida como dieta, tabagismo, sono irregular, inatividade física, e o próprio estresse psicossocial podem levar às alterações do sistema imune (SAH; SINGEWALD, 2025). O estresse influencia o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema nervoso autônomo e, finalmente, o sistema imunológico com aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatória e de PCR e diminuição de IL-10, citocina anti-inflamatória (WON; KIM, 2020). Estudos mostram que as alterações nessas citocinas se correlacionam com escores de ansiedade e podem contribuir tanto para o início quanto para a sua progressão (GASPERSZ *et al.*, 2017; VAN EEDEN *et al.*, 2021).

Estudos sobre a função imunológica também relataram alterações no perfil de linfócitos circulantes, em particular linfócitos T auxiliar, linfócitos B e células NK (RAPAPORT, 1998). Além disso, a ativação e as alterações funcionais das células imunológicas, como monócitos e linfócitos T, podem impactar os neurotransmissores, contribuindo para a fisiopatologia da ansiedade (MA *et al.*, 2024).

O comportamento do perfil imune na depressão e na ansiedade não está bem definido. Alguns achados sugerem alterações na ativação do sistema imunológico inato e outros apontam para uma redução da imunidade adaptativa, resta saber se representam dois processos independentes ou relacionados (BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020; CEN *et al.*, 2024; NAJJAR *et al.*, 2013; QURESHI *et al.*, 2024; ZUO *et al.*, 2024).

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Embora a contagem das subpopulações de linfócitos seja importante e utilizada em diferentes situações clínicas, os IR utilizados no Brasil são baseados em dados originados em outros países e populações. Ademais, a população brasileira apresenta grande diversidade étnica, além de hábitos e comportamentos próprios, o que pode tornar os IR obtidos em outras populações inadequados para uso no nosso país.

Além disso, fatores biológicos como idade e sexo e hábitos de vida como obesidade, tabagismo, consumo de álcool, atividade física, diabetes e hipertensão e os distúrbios emocionais como ansiedade e depressão podem modificar a atividade do sistema imune e alterar as subpopulações de linfócitos.

Dessa forma, definir IR específicos de subpopulações de linfócitos da população brasileira pode fornecer informações importantes que permitam a interpretação mais fidedigna e adequada dos resultados dos exames laboratoriais em inúmeras situações clínicas.

Nossa hipótese é que os IR das subpopulações de linfócitos da população brasileira são diferentes dos IR encontrados em outras populações e que idade, sexo, hábitos de vida, obesidade, diabetes, hipertensão, ansiedade e depressão podem estar associados à distribuição das subpopulações de linfócitos em nossa população.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Avaliar a distribuição das subpopulações de linfócitos em participantes do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil) do Estado de Minas Gerais (MG).

4.2. Objetivos específicos

- Determinar o IR das subpopulações de linfócitos;
- Avaliar potenciais variações do IR por sexo e faixas etárias;
- Avaliar a distribuição e a associação das subpopulações de linfócitos de acordo com idade e sexo;
- Avaliar a distribuição e a associação das subpopulações de linfócitos de acordo com o índice de massa corporal (IMC), tabagismo, uso de álcool, atividade física diabetes e hipertensão;
- Avaliar a distribuição e a associação das subpopulações de linfócitos na depressão e na ansiedade.

5. MATERIAS E MÉTODOS

5.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo transversal que utilizou os dados da terceira visita de exames e entrevistas do ELSA-Brasil, realizada entre 2016 e 2018. O ELSA-Brasil é desenvolvido em seis instituições de ensino superior e pesquisa, localizadas em diferentes regiões do Brasil: Universidade Federal de Minas Gerais - MG, Universidade de São Paulo - SP, Fundação Oswaldo Cruz - RJ, Universidade Federal do Espírito Santo - ES, Universidade Federal da Bahia - BA e Universidade Federal do Rio Grande do Sul - RS. Os principais objetivos do ELSA-Brasil são investigar a incidência e a progressão do diabetes e das doenças cardiovasculares e examinar os fatores biológicos, comportamentais, ambientais, ocupacionais, psicológicos e sociais relacionados a essas doenças e às suas complicações. A linha de base do ELSA-Brasil foi realizada entre 2008 e 2010, a visita 2 entre 2012 e 2014, e a visita 3 entre 2016 e 2018, mais informações disponíveis em (AQUINO *et al.*, 2012; SCHMIDT *et al.*, 2015).

5.2. População do estudo

Este estudo transversal foi conduzido em uma amostra de conveniência de 556 participantes da terceira visita de estudo do ELSA-Brasil, que passaram pela coleta de dados no Centro de Investigação de Minas Gerais e foram submetidos à coleta de sangue para exames laboratoriais e determinação da contagem de linfócitos e suas respectivas subpopulações.

5.2.1. População de estudo do Artigo 1

Foram elegíveis para participar das análises do Artigo 1 todos os 556 participantes com idade entre 42 e 82 anos, que tiveram a coleta de sangue realizada na terceira visita do estudo para determinação da contagem absoluta e das subpopulações de linfócitos. Variáveis demográficas (sexo, idade, raça), tabagismo e consumo de álcool foram recuperados do banco de dados do Projeto ELSA-Brasil.

Os critérios de inclusão foram: (1) ser participante do estudo; (2) ter participado da visita três; (3) ter realizado a coleta de sangue para determinação da contagem absoluta e das subpopulações de linfócitos. Os critérios de exclusão foram: 1. Neoplasia autorreferida obtida na linha de base do estudo; 2. Histórico de realização de cirurgia bariátrica; 3. Auto declaração de processo infeccioso recente e qualquer problema de saúde nas últimas 12 horas; 4. Auto percepção da saúde ruim ou muito ruim; 5. Doença autoimune (artrite, lúpus, retocolite, psoríase) e gota autorreferida na terceira visita; 6. Uso de imunossupressores; 7. Uso de antivirais; 8. Uso de antibióticos; 9. Uso de anti-inflamatórios não esteroides; 10. Uso de corticoides; 11. $\text{PCR} \geq 10\text{mg/L}$.

Assim, para o primeiro artigo a amostra foi composta por 351 participantes.

5.2.2. População de estudo do Artigo 2

Para a análise do Artigo 2, foram elegíveis todos os 556 participantes com idades entre 42 e 82 anos submetidos à coleta de sangue para determinação de linfócitos e suas respectivas subpopulações. Similarmente, as variáveis demográficas (sexo, idade, raça), de tabagismo e consumo de álcool foram obtidas do banco de dados do Projeto ELSA-Brasil.

Os critérios de inclusão foram: (1) ser participante do Estudo; (2) ter participado da visita três; (3) ter realizado a coleta de sangue para determinação da contagem absoluta e das subpopulações de linfócitos.

Desses participantes, excluímos os indivíduos com dados faltantes para todas as variáveis e com pontos extremos (outliers) nas subpopulações de linfócitos. Assim, a amostra para o segundo artigo foi composta por 480 participantes.

5.2.3. População de estudo depressão e ansiedade

Foram elegíveis para participar das análises de depressão e ansiedade toda a amostra de 351 participantes selecionados para o Artigo 1.

5.3. Variáveis do estudo

5.3.1. Faixa etária e hábitos de vida

A definição das faixas etárias foi estabelecida de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo considerados adultos aqueles com menos de 60 anos e pessoa idosa aqueles com 60 anos ou mais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

Em relação ao tabagismo, os participantes foram categorizados em três categorias: não fumantes, os que nunca fumaram; ex-fumantes, aqueles que foram fumantes anteriormente (pelo menos 100 cigarros na vida) e que não fumam atualmente e; fumantes, os participantes que fumam atualmente, sejam cigarros industrializados ou eletrônicos.

Os bebedores excessivos foram definidos com base na ingestão de álcool: para homens ≥ 210 g álcool/semana, e para mulheres ≥ 140 g álcool/semana, considerando 5% de etanol na composição da cerveja (MOLINA *et al.*, 2013).

O IMC foi calculado pela razão entre o peso corporal (kg) e a altura (em metros) elevada ao quadrado, ou seja, $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura (m)} \times \text{altura (m)}$. O IMC foi dividido em 4 categorias: magro, eutrófico, sobrepeso e obeso.

A atividade física de lazer foi avaliada usando a versão longa do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) e definida como baixa (< 600 MET min/semana), moderada ($600\text{--}3000$ MET-min/semana) ou vigorosa (≥ 3000 METmin/semana) (MATSUDO *et al.*, 2012).

Hipertensão foi definida com base nos critérios recomendados pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2007): pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg ou pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg; ou pelo uso de medicação anti-hipertensiva nas últimas 2 semanas. A presença de diabetes foi definida com base no diabetes autorrelatado pelo participante; uso de medicação para diabetes nas últimas 2 semanas; ou de acordo com os critérios recomendados pela *American Diabetes Association*: glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL com tempo de jejum ≥ 8 h ou hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$ ou glicemia 2h após carga ≥ 200 mg/dL (ADA, 2014).

5.3.2. Avaliação de depressão e ansiedade

Uma versão brasileira adaptada do *Clinical Interview Scheduled Revised* (CIS-R) (Anexo 1) foi usada para avaliar sintomas mentais e transtornos psiquiátricos (NUNES *et al.*, 2012). Esta é uma entrevista estruturada usada para o diagnóstico de condições psiquiátricas não psicóticas comuns e atuais na comunidade.

Este questionário é confiável quando aplicado por entrevistadores leigos treinados e é composto por 14 seções: sintomas somáticos, fadiga, concentração e esquecimento, problemas de sono, irritabilidade, preocupação com a saúde física, depressão, ideias depressivas, preocupação, ansiedade, fobias, pânico, compulsões e obsessões. Cada seção apresenta duas questões introdutórias que confirmam a presença do sintoma específico no último mês. Posteriormente, são avaliadas a frequência, duração e gravidade do sintoma positivo nos últimos 7 dias.

Os participantes foram agrupados em dois grupos de acordo com o questionário adaptado do CIS-R e o uso de medicação. O grupo de depressão foi composto por participantes que pontuaram para episódio depressivo leve sem sintomas somáticos, episódio depressivo leve com sintomas somáticos, episódio depressivo moderado sem sintomas somáticos, episódio depressivo moderado com sintomas somáticos, episódio depressivo grave, além do uso de antidepressivo. O grupo de ansiedade foi composto por participantes que pontuaram para agorafobia sem pânico, fobia social, transtorno do pânico, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno obsessivo compulsivo, além do uso de ansiolítico (Tabela 1). O questionário foi aplicado no mesmo dia em que foi realizada a coleta de sangue.

Tabela 1. Agrupamento dos participantes com depressão e ansiedade

Depressão	Ansiedade
Episódio depressivo leve sem sintomas somáticos	Agorafobia sem pânico
Episódio depressivo leve com sintomas somáticos	Fobia social
Episódio depressivo moderado sem sintomas somáticos	Transtorno do pânico
Episódio depressivo moderado com sintomas somáticos	Transtorno de ansiedade generalizada
Episódio depressivo grave	Transtorno obsessivo compulsivo
Uso de antidepressivo	Uso de ansiolítico

5.4. Determinação das subpopulações de linfócitos

Para a determinação da contagem absoluta e das subpopulações de linfócitos, as variáveis pré-analíticas como preparo do participante, cuidados com a coleta, transporte e armazenamento da amostra foram cuidadosamente definidos e aplicados em todas as amostras.

5.4.1. Imunofenotipagem

Foram coletados 5 ml de sangue venoso em tubo contendo EDTA dos 556 participantes, no período de dezembro de 2017 a abril de 2018. Para minimizar a variabilidade circadiana, o sangue venoso foi obtido no mesmo período do dia, entre 7:30 e 9:30. A contagem total de linfócitos de todos os indivíduos estava dentro da faixa de referência (1.000–2.900/ μ L). As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente até a coloração. A determinação dos valores absolutos e relativos das subpopulações de linfócitos T, B e células NK foi realizada por imunofenotipagem por citometria de fluxo no aparelho BD FACSCalibur™. Foram utilizados anticorpos monoclonais (AcMo) contra os CDs celulares conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), complexo peridina-clorofila-proteína (PerCP) e alofococianina (APC). As especificações dos anticorpos monoclonais e os fluorocromos utilizados para marcação das células estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Especificações dos anticorpos monoclonais

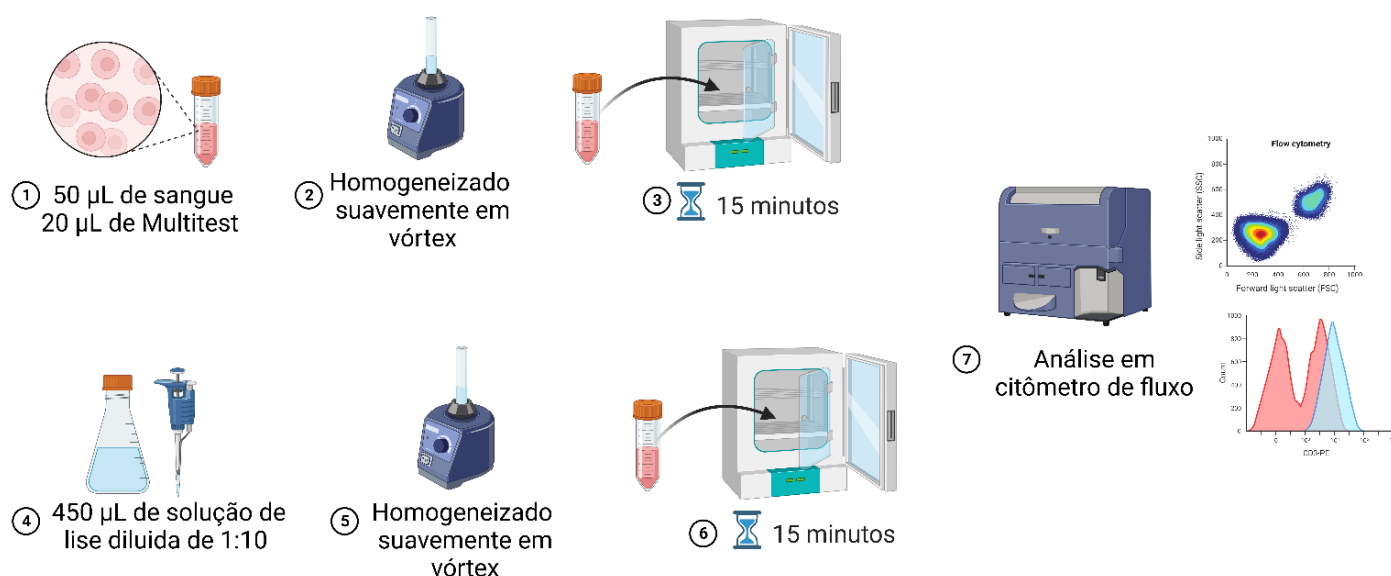
Anticorpo conjugado	Fluorocromo	Células marcadas
Anti-CD45	PerCP	Linfócitos
Anti-CD3	FITC	Linfócitos T
Anti-CD4	APC	Linfócito T auxiliar
Anti-CD8	PE	Linfócito T citotóxico
Anti-CD19	APC	Linfócito B
Anti-CD16+ Anti-CD56	PE	Células NK

O anti-CD45 marcado com PerCP identifica leucócitos; anti-CD3 marcado com FITC reconhece linfócitos T; anti-CD4 marcado com APC reconhece linfócitos T auxiliar; anti-CD8 marcado com FITC reconhece linfócitos T

citotóxico, anti-CD19 marcado com APC reconhece linfócitos B; anti-CD16 e o anti-CD56 em conjunto marcado com PE facilitam a identificação de células NK

Para marcação das células foram pipetados 20 μL do reagente BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 em um tubo de ensaio; em outro tubo foram pipetados 20 μL do reagente BD Multitest CD3/CD16+CD56+/CD45/CD19. A seguir, em ambos os tubos, foram pipetados 50 μL do sangue total utilizando a técnica de pipetagem reversa. Após homogeneização e incubação durante 15 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente (20°C - 25°C), foram adicionados nos tubos 450 μL da solução de lise BD FACS *Lysing Solution* (diluída 1:10 em água destilada); posteriormente os tubos foram fechados, homogeneizados suavemente em vórtex e incubados por 15 minutos ao abrigo da luz, e à temperatura ambiente (20°C - 25°C), deixando assim a amostra pronta para ser analisada no citômetro de fluxo (Figura 7).

Figura 7. Representação esquemática das etapas de preparo da amostra para citometria de fluxo



Fonte: elaborado pelo autor

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur utilizando o software BD MultiSET, sendo adquirido no mínimo 2.000 eventos de linfócitos totais em um total de 20.000 eventos.

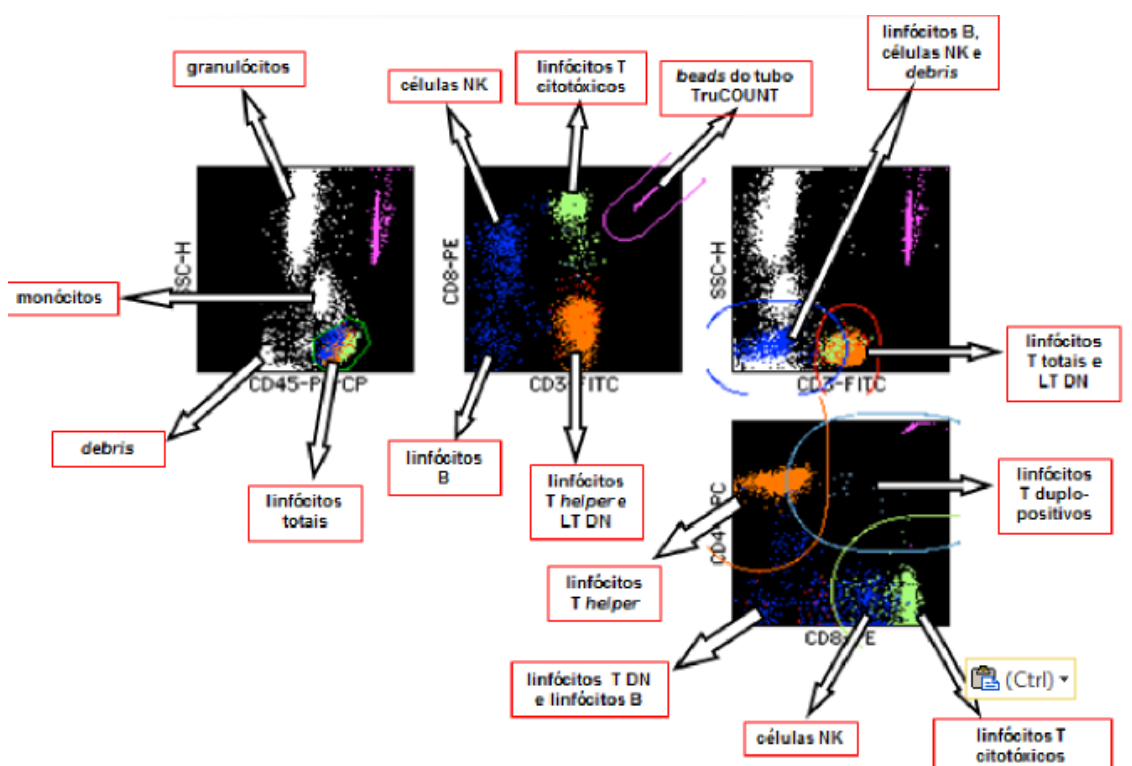
5.4.2. Análise dos dados

A análise dos dados obtidos no citômetro de fluxo foi feita com o *software* BD Multiset™.

O Multiset™, tendo como parâmetros Forward Scatter em escala linear que avalia o tamanho da célula, Side Scatter também em escala linear, que determina a complexidade/granulosidade das células, além dos detectores FL1, FL2, FL3 e FL4 que detectam e exibem, em escala logarítmica, as fluorescências: verde, laranja, vinho e vermelha, ou seja, a reação antígeno-anticorpo conjugada aos fluorocromos FITC, PE, PerCP e APC, respectivamente. Após a aquisição das células de cada amostra, o Multiset™ gera dois laudos: o Lab Report com os gráficos contendo as subpopulações de linfócitos estão presentes (Figura 9), e o Physician Report, com os valores percentuais e absolutos da amostra.

O Multiset™ é capaz de mostrar a localização das subpopulações em gráficos diferentes, o que permite a combinação de marcadores daquele grupo de células, tornando possível sua fenotipagem. Ainda, o software representa as subpopulações em diferentes cores, facilitando assim a identificação de cada uma (Figura 8).

Figura 8. Gráficos com as populações celulares geradas pelo Multiset™



Fonte: RUSSO et al., 2010

No *Physician Report*, o Multiset™ gera os resultados em número de eventos lidos, valores percentuais e valores absolutos, sendo que para esse último é necessária a utilização dos tubos BD TruCount, que é composto por microesferas, ou *beads*, que permitem a obtenção da contagem absoluta de células sem a necessidade de um analisador hematológico. Entretanto, o uso dos tubos BD TruCount aumenta o custo das análises, tornando-as inviáveis em alguns casos. Uma estratégia utilizada para contornar essa situação é a contagem de linfócitos estimada por um analisador hematológico.

A quantificação de subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo pode ser feita usando uma plataforma única/simples ou uma plataforma dupla. Na plataforma simples, a contagem absoluta das subpopulações é determinada diretamente no citômetro de fluxo. Na plataforma dupla, o valor percentual das subpopulações de linfócitos é estimado por uma fórmula matemática (Equação 1) usando dois parâmetros independentes: a contagem absoluta de cada subpopulação de linfócitos obtida no citômetro de fluxo e a contagem de linfócitos estimada por um analisador hematológico.

Sendo assim, utilizando a plataforma dupla, uma vez identificada a contagem absoluta de cada subpopulação de linfócito por citometria de fluxo, esse valor é dividido pela contagem de linfócitos obtidos pelo analisador hematológico e posteriormente esse valor é multiplicado por 100, conforme demonstrado na equação 1. Dessa forma, é possível obter o valor percentual de cada subpopulação de linfócito.

Equação 1: Cálculo do valor percentual das subpopulações de linfócitos

$$\text{Valor percentual de células \%} = \frac{\text{Quantidade absoluta da subpopulação de linfócito}}{\text{Quantidade de linfócitos}} \times 100$$

No presente estudo, os valores percentuais das subpopulações de linfócitos foram calculados por plataforma dupla, a partir da contagem absoluta de cada subpopulação de linfócito obtida por citometria de fluxo (FACSCalibur™ BD) e da contagem de linfócitos obtidos pelo analisador hematológico Sysmex XN-3000.

5.4.3. Controle da qualidade

A calibração e compensação do citômetro de fluxo foram realizadas diariamente com a utilização do reagente BD Calibrite. Durante o processo de calibração, também foram realizados a verificação do Time Delay, teste de sensibilidade e ajuste de voltagem dos fotomultiplicadores.

As determinações dos linfócitos totais e das subpopulações de linfócitos T, B e NK foram realizadas no laboratório do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que participa dos seguintes programas de controle externo da qualidade - Programa de Excelência para Laboratórios Médicos (PELM) da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica - Medicina Laboratorial (SBPC/ML) e *United Kingdom National External Quality Assessment Service* (UK NEQAS) - *Leucocyte Immunophenotyping* (BAINBRIDGE *et al.*, 2018).

5.4.4. Contagem absoluta de linfócitos

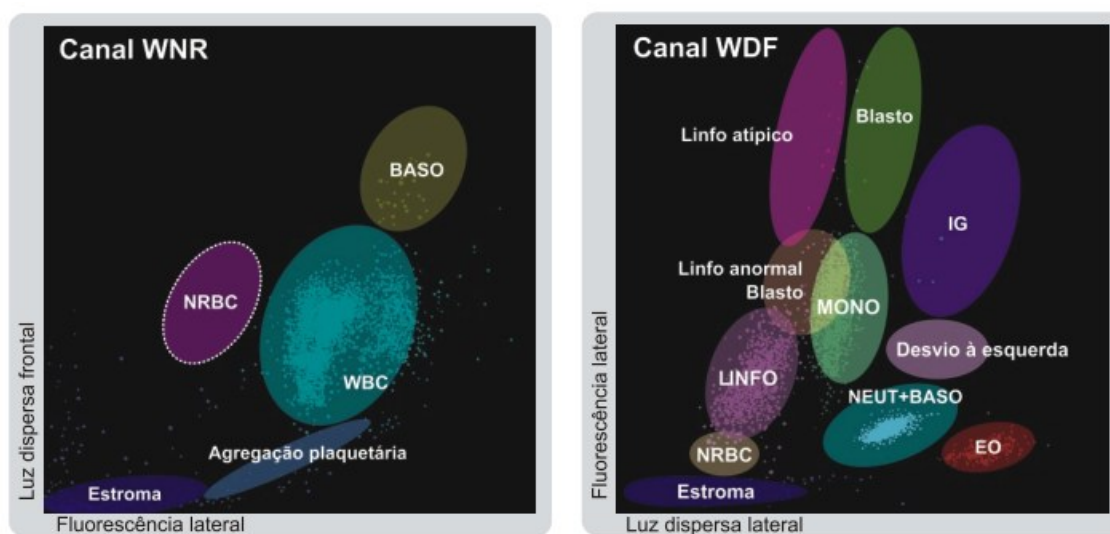
A contagem absoluta dos linfócitos foi realizada pelo analisador hematológico automatizado Sysmex XN-3000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). A contagem diferencial de leucócitos foi liberada automaticamente pelo equipamento e, quando necessário, um esfregaço sanguíneo foi confeccionado para avaliação microscópica e quantificação acurada dos linfócitos totais.

No Sysmex XN-3000, a contagem total e diferencial de leucócitos é realizada através do método de citometria de fluxo. Semelhante ao BD FACSCalibur™, as células são analisadas à medida que passam através de uma célula de fluxo. A amostra de sangue é aspirada, medida e diluída, depois corada com um reagente fluorescente. A amostra posteriormente passa pela célula de fluxo onde as células passam enfileiradas através de um orifício. Um laser emite uma luz que incide sobre as células quando elas passam pelo orifício. A dispersão frontal, lateral e a luz fluorescente lateral são recebidas pelo tubo fotomultiplicador do sistema óptico e convertidas em pulsos elétricos, gerando informações sobre o tamanho, complexidade e o estado de amadurecimento das células (LAUZIN, 2017).

O analisador XN3000 possui quatro canais onde é realizada a identificação dos diferentes tipos celulares: WNR, WDF, PLT-F e RET. No canal WNR, o analisador mede a fluorescência lateral e a dispersão frontal de luz. A fluorescência lateral avalia o conteúdo de

material nucleico para identificação e quantificação de eritroblastos e leucócitos. A luz desviada frontalmente mede o tamanho da célula. No canal WDF é realizada a contagem dos neutrófilos, linfócitos monócitos e eosinófilos, assim como a detecção de células anormais tais como neutrófilos imaturos e linfócitos atípicos (Figura 9) (SYSMEX, 2012, 2019).

Figura 9. Identificação de células nos canais WNR e WDF do analisador hematológico Sysmex XN-3000



NRBC: Eritroblastos, WBC: leucócitos, BASO: basófilos, LINFO: linfócitos, MONO: monócitos, NEUT: neutrófilos; IG: granulócitos imaturos, EO: eosinófilos.

Fonte: SYSMEX, 2014

As amostras foram analisadas tanto no Sysmex XN-3000, quanto no BD FACSCalibur™ no mesmo dia da coleta de sangue.

5.4.5. Comparação de métodos

A comparação de métodos é uma ferramenta de cálculo que tem o objetivo de estimar o erro sistemático (Bias) presente em um sistema analítico quando comparado com outro sistema, selecionado como referência. No estudo de comparação de métodos, é possível estimar a inexactidão do método teste ou verificar se os resultados entre os dois sistemas são concordantes ou equivalentes, além de identificar se o método teste não se desvia do método de referência além do que o definido pelas especificações da qualidade. Portanto, para que os resultados

obtidos nos diferentes equipamentos sejam considerados equivalentes, a diferença das médias entre os resultados tem que ser próxima a zero. Foi considerado como método de referência a contagem do FACSCalibur™ BD e, como método teste, a do Sysmex XN-3000.

Para avaliar a concordância da contagem absoluta de linfócitos totais entre o FACSCalibur™ BD e o analisador hematológico Sysmex XN-3000 foi usado o método de Bland-Altman. Foram avaliadas as médias das contagens absolutas de linfócitos totais de 71 indivíduos analisadas pelos dois equipamentos.

As especificações da qualidade analítica utilizadas foram os componentes da variação biológica, imprecisão, bias e erro total, conforme apresentado na Tabela 3. A análise foi feita utilizando o programa Excel.

Tabela 3. Componentes da variação biológica e especificações da qualidade analítica

Analito	CVi	CVg	CVa	Bias (%)	ET (%)
Linfócitos totais	10,2	35,3	5,1	9,19	17,6

CVi: Variação biológica intra-individual; CVg: Variação biológica intra-grupo; CVa: Coeficiente de variação analítico; Bias: Bias analítico (erro sistemático); ET: Erro total analítico permitido

Fonte: RICOS, 2014

5.5. Análise estatística

As análises dos dados de ambos os artigos foram realizadas por meio do software Stata 14.00 (Stata Corporation, College Station, Estados Unidos), considerando-se um nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

5.5.1. Análise dos dados do Artigo 1

As distribuições das variáveis do estudo foram apresentadas na forma de frequência, média, desvio padrão e mediana. Para avaliação de possíveis desvios da normalidade nas distribuições dos valores medidos foi aplicado o teste Skewness, Kurtosis e Kolmogorov-

Smirnov. O teste de Mann-Whitney foi usado para verificar diferenças entre os subgrupos com valor de significância de $p < 0,05$ (RICOS, 2014).

A verificação de outliers dentro de cada subgrupo foi realizada utilizando o método de Dixon e Reed, também conhecido como razão D/R, sendo D a diferença absoluta entre uma observação extrema (grande ou pequena) e a próxima maior (ou menor) observação, e R o intervalo (máximo-mínimo). Valores extremos foram excluídos da distribuição se $D/R \geq 1/3$ (CLSI, 2008; ENAWGAW *et al.*, 2018).

O IR foi calculado empregando um método não paramétrico, de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo CLSI. Os percentis 2,5 e 97,5 foram considerados como limites de referência inferior e superior, respectivamente, abrangendo 95% como intervalo de confiança. A diretriz CLSI preconiza, ainda, uma amostra de, no mínimo, 120 indivíduos de referência, definidos como “normais”, para cada parâmetro e subgrupo de estratificação que se faça necessário (CLSI, 2008).

A necessidade de recomendar faixas de referência específicas de acordo com idade e sexo para as subpopulações de linfócitos foi estimada por meio do Z-escore, calculado a partir das médias e dos desvios padrão de cada grupo (ENAWGAW *et al.*, 2018; HARRIS; BOYD, 1990), como demonstrado na equação 2:

Equação 2. Cálculo do Z-escore

$$Z = \frac{\text{Média 1} - \text{Média 2}}{(\text{SD1}/N1 + \text{SD2}/N2)^{1/2}}$$

Seguindo essa abordagem, o valor de Z calculado foi comparado com o valor de Z crítico (Z^*), como demonstrado na equação 3:

Equação 3. Cálculo do valor do Z crítico (Z^*)

$$Z^* = 3[(N1 + N2)/240]^{1/2}$$

IR específicos são recomendados se, pelo menos, uma das seguintes condições é atendida:

O Z calculado excede o valor do Z^* crítico ($Z > Z^*$);

Existem diferenças estatísticas entre os parâmetros e o desvio padrão de cada subgrupo e o maior desvio padrão excede o menor desvio padrão 1,5 vezes, ou se a proporção [desvio padrão maior/ (desvio padrão maior - desvio padrão menor)] é inferior a 3 (CLSI, 2008; RIOS *et al.*, 2022).

5.5.2. Análise dos dados do Artigo 2

As distribuições das variáveis do estudo foram resumidas usando frequência, média, desvio padrão e mediana. Para avaliar potenciais desvios da normalidade nas distribuições de valores medidos, foram empregados os testes de Skewness, Kurtosis e Kolmogorov-Smirnov. A identificação de outliers dentro de cada subgrupo foi conduzida usando o método de Dixon e Reed. Valores extremos foram omitidos da distribuição se $D/R \geq 1/3$ (CLSI, 2008; ENAWGAW *et al.*, 2018).

Modelos de regressão robustos foram usados para estimar a magnitude da associação entre subpopulações de linfócitos e fatores sociodemográficos e de estilo de vida. A regressão robusta foi usada, pois é mais apropriada para dados contínuos com outliers e heterocedasticidade. A associação foi feita com idade, sexo, IMC, tabagismo, uso de álcool, atividade física, diabetes e hipertensão.

Modelos de regressão robustos univariados foram construídos para cada subpopulação de linfócitos (variável de resposta): linfócitos totais, linfócitos T, linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, a razão linfócitos T auxiliares/linfócitos T citotóxicos, linfócitos B e células NK, representados pelo modelo bruto (modelo 0). Na análise multivariada, as variáveis que apresentaram um valor de p significativo $< 0,05$ no modelo univariado foram incluídas. Três modelos foram estabelecidos: o modelo 1 foi ajustado para idade e sexo; o modelo 2 foi ajustado para todas as covariáveis no modelo 1 mais IMC; e o modelo 3 foi ajustado para todas as covariáveis no modelo 2 mais tabagismo.

5.5.3. Análise dos dados de depressão e ansiedade

As distribuições das variáveis de depressão e ansiedade do estudo foram apresentadas na forma de frequência e mediana. Para avaliação de possíveis desvios da normalidade nas distribuições dos valores medidos foi aplicado o teste Skewness, Kurtosis e Kolmogorov-Smirnov. O teste de Mann-Whitney foi usado para verificar diferenças entre os subgrupos com valor de significância de $p < 0,05$ (RICOS, 2014).

A verificação de outliers dentro de cada subgrupo foi realizada utilizando o método de Dixon e Reed. Valores extremos foram excluídos da distribuição se $D/R \geq 1/3$ (CLSI, 2008; ENAWGAW *et al.*, 2018).

5.6. Aspectos éticos

As amostras biológicas foram coletadas dos participantes do projeto ELSA-Brasil, após consentimento livre e esclarecido. O sigilo dos pacientes foi garantido pela utilização dos resultados de exames plotados em planilhas de Excel e identificados através de números, sendo sua identidade preservada. Os resultados do estudo serão utilizados somente para fins científicos e os pesquisadores assumem o compromisso de preservar seu anonimato. O ELSA-Brasil possui aprovação pelo Comitê de Ética (186/06) (Anexo 2), bem como a visita 3 de avaliação dos participantes (1.901.617) (Anexo 3).

6. RESULTADOS

O primeiro artigo aborda a determinação do IR das subpopulações de linfócitos T, linfócitos B e células NK, bem como suas variações por sexo e faixa etária.

O segundo artigo aborda a distribuição das subpopulações de linfócitos e sua possível associação com sexo, idade, hábitos de vida, diabetes e hipertensão.

A terceira parte dessa seção apresenta os resultados da distribuição das subpopulações de linfócitos e possível associação com depressão e ansiedade.

6.1. Artigo 1: Establishing the reference intervals for subpopulations of t lymphocytes, b lymphocytes, and natural killer cells: insight from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-BRASIL)

Authors: I. C. S. Dias¹;
E-mail: ingrid.carolinee@hotmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8260-1616>

C. B. Maluf, MD, PhD^{1,2};
E-mail: chams@ufmg.br
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3690-2554>

S. G. Xavier, MD, PhD²;
E-mail: sandraguerra@ufmg.br
ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0626-8988>

L. Giatti, MD, PhD³
E-mail: luana.giatti@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5454-2460>

S. M. Barreto, MD, PhD³
E-mail: sandhi.barreto@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7383-7811>

P. G. Vidigal, MD, PhD^{1,2*}
E-mail: pedrovidigal@ufmg.br
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8035-1350>

Affiliation:1. Posgraduate Program in Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

2. Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

3. Posgraduate Program in Public Health, School of Medicine and EBSEH/Clinical Hospital, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

Corresponding author:

Pedro Guatimosim Vidigal, MD, PhD
E-mail: pedrovidigal@ufmg.br
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8035-1350>

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study was to establish reference intervals for lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of Brazilian adults, and to assess potential variations by gender and age groups. **Methods:** The study assessed 351 healthy participants of the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). Lymphocyte subpopulations were analyzed by dual platform using automated hematological analyzer Sysmex XN-3000 and the four-color flow cytometer on the FACSCalibur. Reference intervals were established using the 2.5th and 97.5th percentiles. Z-score was employed to ascertain the need for distinct reference intervals across gender and age groups. The Mann-Whitney test, with a significance level set at $p < 0.05$, was conducted to identify differences among the population groups. **Results:** The absolute and relative reference intervals were: total lymphocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$): 1.0 - 2.9; CD3+: 721.0 – 2311.5 cells/ μL , 59.1 - 84.5%; CD4+: 421.4 – 1523.8 cells/ μL , 32.5 - 61.6%; CD8+: 175.3 – 879.8 cells/ μL , 12.3 - 39.1%; CD4+CD8+: 0.8 - 4.1 cells/ μL ; CD19+: 85.2 - 501.6 cells/ μL , 5.6 - 21.0%; NK: 83.9 – 444.4 cells/ μL , 4.3- 23.5%. Significant differences were observed in both the relative and absolute values of most lymphocyte subpopulations between genders and age. There are variations in lymphocyte subsets across the global population, underscoring the need to establish tailored reference intervals for distinct populations. Considering separate reference intervals for men and women, particularly for Helper T lymphocyte, B lymphocytes and NK cells, may be warranted.

Keywords: reference value, lymphocyte subpopulations, flow cytometry

Running title: Reference intervals for subpopulations of lymphocytes

1. Introduction

Lymphocyte subset analysis is pivotal in addressing primary immunodeficiencies, a set of genetically diverse diseases that impact various components of innate and adaptive immunity, including neutrophils, macrophages, dendritic cells, complement system proteins, natural killer (NK) cells, as well as B and T lymphocytes. It is also beneficial in managing acquired immunodeficiencies, particularly in the initial laboratory assessment of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected patients. This aids in evaluating overall health status and the effectiveness of antiretroviral therapy (1). Moreover, it holds prognostic significance in other diseases, such as Coronavirus Disease (COVID-19), sepsis, lymphoproliferative disorders, and cancer (2–6). Laboratory test results are frequently compared to reference values or intervals, which is crucial for clinical interpretation, decision-making, and patient monitoring. Essential factors in determining an appropriate reference interval include population characteristics and control of pre-analytical and analytical interferences. The reference value for a specific analyte within a population can be determined from measurements taken in a relatively small but representative group of individuals (7).

Few Brazilian studies have specifically evaluated lymphocyte and NK cell subpopulations in adults. Despite these Brazilian studies, most reference ranges for lymphocyte subpopulations used in Brazil are based on data from other countries (8). Therefore, the aim of this study was to establish reference intervals for lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of Brazilian adults and to assess potential variations by gender and age groups.

2. Methods

2.1 Study population

The study population comes from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil), a prospective multicenter and multiethnic study of public civil servants from teaching and research institutions located in six Brazilian states (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, and Rio Grande do Sul). This cross-sectional study was conducted with a convenience sample of 556 participants from the third study visit of ELSA-Brasil, who underwent data collection at the Minas Gerais Investigation Center. The baseline for ELSA-Brasil took place between 2008 and 2010, the second study visit occurred from 2012

to 2014, and the third study visit spanned from 2016 to 2018. Further details on the study design and cohort profile can be found elsewhere (9).

All 556 participants, aged between 42 and 82 years, underwent blood collection to determine lymphocytes and their respective subpopulations. Demographic variables (gender, age, race), smoking, and alcohol consumption data were retrieved from the ELSA-Brasil Project database.

The definition of age groups adhered to the criteria set by the World Health Organization (WHO), categorizing adults as individuals under 60 years old and elderly individuals aged 60 years or older (10).

The exclusion criteria were as follows: 1. Self-reported neoplasia documented at the study baseline; 2. History of bariatric surgery; 3. Self-report of recent infectious conditions or any health issues within the past 12 hours; 4. Self-rated health as 'bad' or 'very bad'; 5. Self-reported autoimmune diseases (such as arthritis, lupus, colitis, and psoriasis) at the third study visit; 6. Use of immunosuppressants; 7. Use of antivirals; 8. Use of antibiotics; 9. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs; 10. Use of corticosteroids; and 11. C-reactive protein levels $\geq 10\text{mg/L}$ at the third study visit.

In a preliminary analysis using smoking, excessive drinking, hypertension, and diabetes as exclusion factors, no significant difference was observed in the reference range defined for these cells (data not shown). Consequently, these individuals were not excluded from the study.

2.2 Determination of lymphocyte subpopulations

Between December 2017 and April 2018, five milliliters (mL) of venous blood were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes. To minimize circadian variability, venous blood was obtained within the same time-period of the day, between 7:30 and 9:30. The total lymphocyte count of all the subjects was within the reference range ($1.000\text{--}2.900/\mu\text{L}$). Samples were stored at room temperature until staining.

Lymphocyte subpopulations were analyzed by dual platform using automated hematological analyzer Sysmex XN-3000 and the four-color flow cytometer on the FACSCalibur.

Total lymphocyte count was measured with an automated hematological analyzer Sysmex XN-3000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Four-color combinations of the following monoclonal antibodies were used: CD45-PerCP/CD3-FITC/CD4-APC/CD8-PE/CD19-APC and CD16+CD56-PE (BD Multitest). $50\ \mu\text{L}$

of EDTA blood was added to an aliquot of monoclonal antibody as suggested by the manufacturer and incubated for 15 min protected from light at room temperature. After incubation, erythrocytes were lysed with BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company). Samples were then acquired on the flow cytometer.

Staining was always undertaken on the day of sampling, within 4 hours. Four-color-flow cytometric analysis was performed on FACSCalibur™ flow cytometer (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, USA). Acquisition was run until 20.000 events were detected. Data analyses were made with MultiSET software. Using the appropriate “gating” approach, the relative frequencies were determined for T-cells (CD3+), T-helper cells (CD3 + CD4+), cytolytic T-cells (CD3 + CD8+), B-cells (CD3 – CD19+), NK-cells (CD3 – CD16+/56+). Since we work with a dual platform, the absolute frequencies of the cell's subsets were calculated based on the relative frequencies on total lymphocytes.

Calibration and compensation of the flow cytometer were performed daily using the BD Calibrite™ reagent, as indicated on the package insert. During the calibration process, Time Delay verification, sensitivity testing and voltage adjustment of the photomultiplier (PMTs) were carried out, and report was stored in the instruments. All the calibrators were stored in cold room at controlled temperature.

The total lymphocyte count and determined relative frequency of lymphocyte subpopulations was measured in the laboratory of the University Hospital of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), participant in the following external quality control programs - Excellence Program for Medical Laboratories (PELM) of the Brazilian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (SBPC/ML) and *United Kingdom National External Quality Assessment Service* (UK NEQAS) - *Leucocyte Immunophenotyping*.

2.3 Statistical analysis

The distributions of study variables were summarized using frequency, mean, standard deviation, and median. To evaluate potential deviations from normality in the measured value distributions, Skewness, Kurtosis, and Kolmogorov-Smirnov tests were employed. Differences between subgroups were examined using the Mann-Whitney test, with significance level of $p < 0.05$.

Outlier identification within each subgroup was conducted using the Dixon and Reed method, commonly referred to as the D/R ratio. Extreme values were omitted from the distribution if $D/R \geq 1/3$ (7,11).

Reference intervals were calculated using a non-parametric method in accordance with the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. The 2.5th and 97.5th percentiles were utilized as the lower and upper reference limits, respectively, providing a 95% confidence interval (7).

The necessity of recommending specific reference intervals for lymphocyte subpopulations based on age and gender was assessed using the Z-score. The Z-score was calculated from the means and standard deviations of each group (11,12), as demonstrated in Equation 1, where SD is standard deviation and N is the number of individuals of each group

Equation 1. Z-Score Calculation

$$Z = \frac{\text{Mean 1} - \text{Mean 2}}{(\text{SD1}/N1 + \text{SD2}/N2)^{1/2}}$$

Following this approach, the calculated Z-score is compared with the critical Z-score (Z^*), as demonstrated in Equation 2, where N is the number of individuals in each group and 240 is the sum of the minimum of 120 individuals that must be in each group for partitioning.

Equation 2. Calculation of the critical Z-score (Z^*)

$$Z^* = 3[(N1 + N2)/240]^{1/2}$$

Specific reference intervals are recommended if any of the following conditions are met:

- 1) The calculated Z-score exceeds the critical Z-score value ($Z > Z^*$);
- 2) Statistical differences exist between the parameters, and the standard deviation of each subgroup. This criterion is met when the larger standard deviation exceeds the smaller one by 1.5 times, or when the ratio [larger standard deviation / (larger standard deviation - smaller standard deviation)] is less than 3 (7,13).

2.4 Ethical aspects

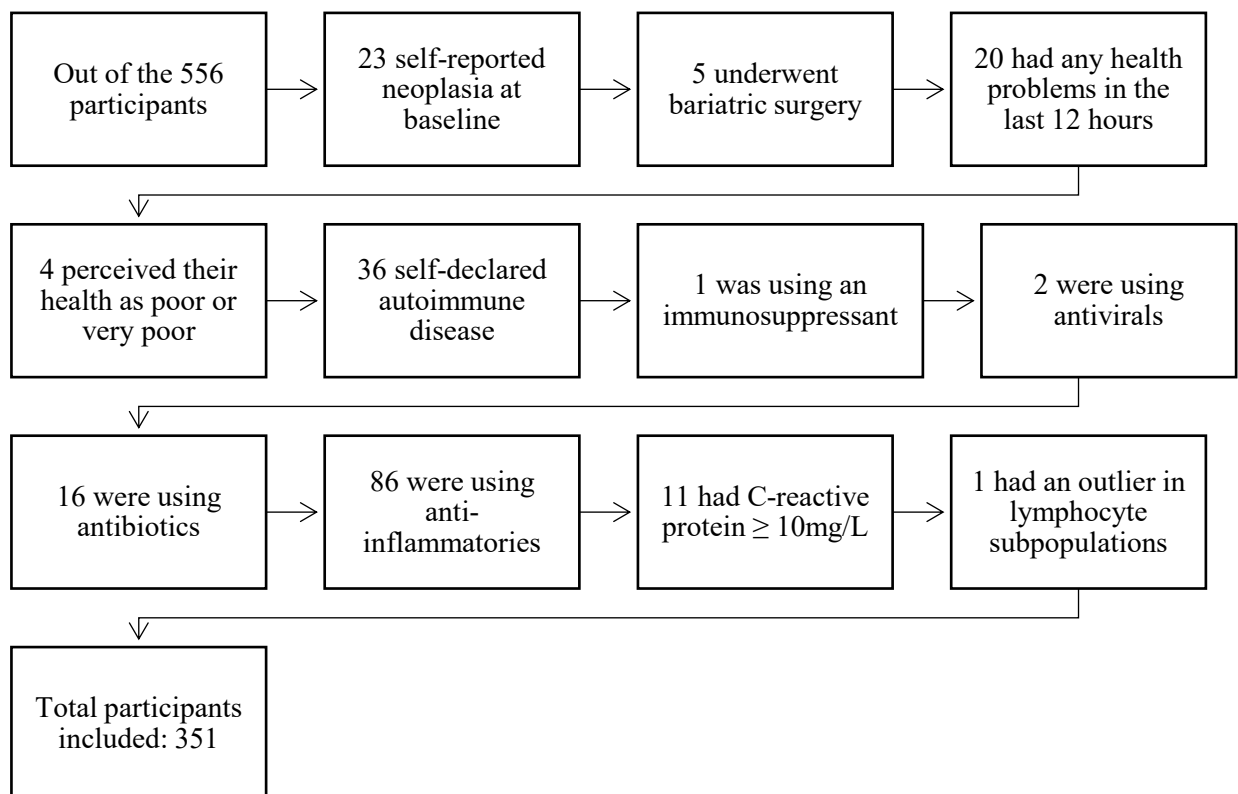
Biological samples were collected from ELSA-Brasil project participants after obtaining free and informed consent. The ELSA-Brasil project holds approval from the ethics committee (186/06) as well as for the third wave of participant assessment (1.901.617).

3. Results

3.1 Sociodemographic and clinical data

After applying the exclusion criteria to the initial 556 participants, 205 of them were excluded, as shown in Figure 1. This resulted in the selection of 351 participants as the reference individuals for determining reference intervals.

Figure 1. Exclusion criteria



The sociodemographic characteristics of this population are represented in Table 1. The reference population exhibited a slight male predominance (50.1%) with an average age of 58.6 years. About 54.4% were adults. The majority identified as white (52.9%) and had completed higher education or postgraduate studies (74.5%).

Table 1. Sociodemographic Characteristics of the Reference Population

Characteristic	Participants (N=351)
Gender	
Male, N (%)	176 (50.1)
Female, N (%)	175 (49.8)
Mean age $\pm$ SD	58.6 $\pm$ 8.1
Age range	42 - 82
Adult and Elderly	
Adult <60 years, N (%)	191 (54.4)
Elderly $\geq$ 60 years, N (%)	160 (45.5)
Race	
White, N (%)	186 (52.9)
Black ^a , N (%)	154 (43.8)
Other ^b , N (%)	10 (2.8)
Education	
Elementary, N (%)	16 (4.5)
High School, N (%)	73 (20.8)
Higher Education, N (%)	82 (23.3)
Postgraduate, N (%)	180 (51.2)

Abbreviations: N = number of participants; SD = standard deviation of the mean

^a Blacks (Blacks and Browns)

^b Others (Asian and Indigenous)

3.2 Comparison between groups

When comparing lymphocyte subpopulation values between groups based on gender, we noticed that the absolute and relative values of nearly all lymphocyte subtypes were significantly higher in women, except for NK cells, which were significantly more numerous in men ($p=0.0001$) (Table 2).

Table 2. Total lymphocyte and lymphocyte subpopulation count by gender.

Parameter	Median (P25 - P75)		p value†
	Male (N=176)	Female (N=175)	
Total Lymphocytes (x10³/μL)	1.7 (1.4 - 2.1)	1.8 (1.5 - 2.1)	0.0999
T Lymphocyte (CD3+)			
Absolute number (Cells/μL)	1276.7 (1039.9 - 1558.6)	1388.8 (1119.9 - 1692.3)	0.0211
Relative number (%)	72.3 (67.9 - 77.3)	74.5 (70.9 - 78.2)	0.0136

**Helper T Lymphocyte
(CD3+/CD4+)**

Absolute number (Cells/ μ L)	787.5 (626.7 - 992.6)	916.1 (740.5 - 1139.4)	0.0002
Relative number (%)	46 (40.3 - 50.2)	49.2 (43.8 - 54.7)	0.0000

**Cytotoxic T Lymphocyte
(CD3+/CD8+)**

Absolute number (Cells/ μ L)	443.0 (308.5 - 581.4)	435.5 (334.5 - 571.4)	0.8568
Relative number (%)	24.3 (18.7 - 30.9)	22.8 (18.8 - 28.1)	0.1245

CD4+/CD8+ Ratio

1.8 (1.3 - 2.5)	2.1 (1.6 - 2.7)	0.0048
-----------------	-----------------	---------------

B Lymphocyte (CD19+)*

Absolute number (Cells/ μ L)	197.6 (148.5 - 264.5)	235.7 (187.6 - 329.7)	0.0000
Relative number (%)	10.9 (8.4 - 14.3)	13.5 (10.42 - 16.2)	0.0000

Natural Killer Cell (NK)*

Absolute number (Cells/ μ L)	221.0 (159.5 - 304.2)	184.3 (144.7 - 245.0)	0.0001
Relative number (%)	12.2 (9.5 - 17.3)	9.9 (7.5 - 12.7)	0.0000

Abbreviations: CD= cluster of differentiation, N = number of participants

* The sum of observations may differ in some variables due to missing data

† Teste de Mann-Whitney

Regarding age groups, we found that the absolute numbers of T lymphocytes ($p=0.0480$), absolute and relative numbers of cytotoxic T lymphocytes ($p=0.065$), and B lymphocytes ($p=0.0004$) were significantly higher in adults. Conversely, in the elderly group, the ratio helper T lymphocyte/ cytotoxic T lymphocytes ($p=0.0487$) and NK cells were significantly higher ($p=0.0311$) (Table 3).

Table 3. Total lymphocyte and lymphocyte subpopulation count by by Age Group

Parameter	Median (P25 - P75)		p value P†
	Adult (N=191)	Elderly (N=160)	
Total Lymphocytes ($\times 10^3/\mu$L)	1.8 (1.5 - 2.2)	1.7 (1.4 - 2.1)	0.0566
T Lymphocyte (CD3+)			
Absolute number (Cells/ μ L)	1344.6 (1114.5 - 1696.0)	1337.7 (1029.7 - 1579.6)	0.0480
Relative number (%)	74.5 (70.3 - 78.5)	73.4 (68.7 - 77.6)	0.2195
Helper T Lymphocyte (CD3+/CD4+)			
Absolute number (Cells/ μ L)	864.5 (690.7 - 1121.2)	804.1 (650.2 - 1065.1)	0.1711
Relative number (%)	47.2 (42.4 - 51.8)	47.7 (41.8 - 54.6)	0.5153
Cytotoxic T Lymphocyte (CD3+/CD8+)			
Absolute number (Cells/ μ L)	468.2 (337.8 - 589.1)	405.2 (298.5 - 538.0)	0.0065

Relative number (%)	24.49 (20.2 - 29.3)	22.5 (17.6 - 28.4)	0.0217
CD4+/CD8+ Ratio	1.8 (1.4 - 2.4)	2.1 (1.4 - 2.8)	0.0487
B Lymphocyte (CD19+)*			
Absolute number (Cells/ μ L)	233.2 (178.0 - 317.1)	198.9 (146.0 - 263.5)	0.0004
Relative number (%)	12.9 (10.0 - 15.7)	11.0 (8.4 - 14.5)	0.0008
Natural Killer Cell (NK)*			
Absolute number (Cells/ μ L)	190.1 (150.6 - 255.1)	213.6 (153.5 - 282.5)	0.0311
Relative number (%)	10.1 (7.8 - 13.5)	11.9 (9.2 - 16.6)	0.0003

Abbreviations: CD= cluster of differentiation, N =number of participants

* The sum of observations may differ in some variables due to missing data

† Teste de Mann-Whitney

3.3 Reference intervals

Table 4 presents the median, 2.5th and 97.5th percentiles representing the lower and upper limits of the reference intervals for lymphocyte subpopulations.

Table 4. Reference Intervals for Lymphocyte Subpopulations for the study population

Parameter	Reference Intervals	Median
Total Lymphocytes ($\times 10^3/\mu$L)	1.0 - 2.9	1.8
T Lymphocyte (CD3+)		
Absolute number (Cells/ μ L)	721.0 - 2311.5	1339.6
Relative number (%)	59.1 - 84.5	73.6
Helper T Lymphocyte (CD3+/CD4+)		
Absolute number (Cells/ μ L)	421.4 - 1523.8	831.4
Relative number (%)	32.5 - 61.6	47.3
Cytotoxic T Lymphocyte (CD3+/CD8+)		
Absolute number (Cells/ μ L)	175.3 - 879.8	436.6
Relative number (%)	12.3 - 39.1	23.1
CD4+/CD8+ Ratio	0.8 - 4.1	1.9
B Lymphocyte (CD19+)*		
Absolute number (Cells/ μ L)	85.2 - 501.6	215.2
Relative number (%)	5.68 - 21.0	12.1
Natural Killer Cell (NK)*		
Absolute number (Cells/ μ L)	83.9 - 444.4	202.8

Relative number (%) 4.3 - 23.5 10.9

Abbreviations: CD = cluster of differentiation

* The sum of observations may differ in some variables due to missing data

3.4 Reference intervals by gender

Table 5 presents the reference values for lymphocyte subpopulations according to gender.

Table 5. Reference Intervals for of Lymphocyte Subpopulations by Gender

Parameter	Reference Intervals		Median	
	Male (N=176)	Female (N=175)	Male (N=176)	Female (N=175)
Total Lymphocytes (x10³/μL)	1.0 - 2.8	1.1 - 3.0	1.7	1.8
T Lymphocyte (CD3+)				
Absolute number (Cells/μL)	710.1 - 2209.7	783.8 - 2324.3	1276.7	1388.8
Relative number (%)	57.7 - 87.9	62.4 - 84.5	72.3	74.5
Helper T Lymphocyte (CD3+/CD4+)				
Absolute number (Cells/μL)	403.6 - 1445.1	447.4 - 1645.4	787.5	916.1
Relative number (%)	28.9 - 60.7	35.9 - 62.0	46	49.2
Cytotoxic T Lymphocyte (CD3+/CD8+)				
Absolute number (Cells/μL)	175.5 - 932.2	175.3 - 851.3	443.0	435.5
Relative number (%)	12.5 - 41.4	12.0 - 36.2	24.35	22.8
CD4+/CD8+ Ratio	0.6 - 4.0	0.9 - 4.2	1.8	2.1
B Lymphocyte (CD19+)*				
Absolute number (Cells/μL)	71.6 - 458.6	87.2 - 547.9	197.6	235.7
Relative number (%)	5.3 - 20.1	5.9 - 22.1	10.9	13.5
Natural Killer Cell (NK)*				
Absolute number (Cells/μL)	83.9 - 477.2	85.8 - 368.7	221.0	184.3
Relative number (%)	5.2 - 25.8	4.0 - 18.9	12.2	9.9

Abbreviations: CD= cluster of differentiation, N = number of participants

* The sum of observations may differ in some variables due to missing data

After applying the Harris-Boyd Z-test to assess the need for defining gender-specific reference intervals, we observed the necessity for such intervals for the absolute and relative counts of helper T lymphocytes, B lymphocytes, and NK cells. The other lymphocyte subpopulations results did not indicate the same need.

3.5 Reference intervals by age

Table 6 presents the reference intervals for lymphocyte subpopulations categorized by age.

Table 6. Reference Intervals for Lymphocyte Subpopulations by Age

Parameter	Reference Intervals		Median	
	Adult (N=191)	Elderly (N=160)	Adult (N=191)	Elderly (N=160)
Total Lymphocytes (x10³/μL)	1.1 - 2.9	1.0 - 2.9	1.8	1.7
T Lymphocyte (CD3+)				
Absolute number (Cells/μL)	808.6 - 2280.4	651.7 - 2398.2	1344.6	1337.7
Relative number (%)	59.4 - 84.1	57.7 - 85.3	74.52	73.4
Helper T Lymphocyte (CD3+/CD4+)				
Absolute number (Cells/μL)	447.4 - 1521.1	375.9 - 1549.6	864.5	804.1
Relative number (%)	32.6 - 61.2	32.1 - 61.8	47.2	47.7
Cytotoxic T Lymphocyte (CD3+/CD8+)				
Absolute number (Cells/μL)	205.4 - 893.5	153.7 - 879.8	468.2	405.2
Relative number (%)	12.8 - 37.1	11.2 - 43.0	24.4	22.5
CD4+/CD8+ Ratio	0.8 - 3.7	0.6 - 4.4	1.8	2.1
B Lymphocyte (CD19+)*				
Absolute number (Cells/μL)	87.6 - 517.9	69.1 - 498.5	233.2	198.9
Relative number (%)	7.0 - 21.0	5.3 - 21.6	12.9	11.0
Natural Killer Cell (NK)*				
Absolute number (Cells/μL)	75.5 - 405.8	92.8 - 456.0	190.1	213.6
Relative number (%)	4.3 - 22.7	4.0 - 24.1	10.1	11.9

Abbreviations: CD = cluster of differentiation, N = number of participants

* The sum of observations may differ in some variables due to missing data

After applying the Harris-Boyd Z-test to assess the need for age-specific reference intervals for adults and the elderly, we found no indication to partition any of the lymphocyte subpopulations.

4. Discussion

In this study, we established reference intervals for lymphocyte subpopulations in peripheral blood in Brazilian adults, examining potential variations by gender and age groups. Our findings revealed statistically significant differences between genders, with most lymphocyte subtypes having significantly higher absolute and relative values in women, notably B lymphocytes, while NK cells displayed greater values in men, suggesting the need of having different reference intervals for men and women. Concerning age groups, statistically significant differences emerged, with adults showing higher absolute and relative values of cytotoxic T lymphocytes and B lymphocytes, and the elderly demonstrating significantly higher absolute and relative values of NK cells. However, statistical tests indicated that partitioning by age groups was unnecessary.

Significant variations in T lymphocyte, B lymphocyte, and NK cell counts have been observed among populations across different global regions, underscoring the necessity of establishing distinct reference intervals tailored to specific geographical areas (14–17).

Table 7 presents studies that have defined reference intervals for lymphocytes and their subpopulations in different populations from various regions worldwide.

Table 7. Reference Intervals for Lymphocytes in Different Regions of the World

Study	ELSA-MG	Sahmoudi et al. (17)	Mishra et al (18)	Cumbane et al. (19)	Jentschullrich et al. (20)	Valiathan et al. (21)
Country	Brazil	Morocco	Nepal	Mozambique	Germany	Florida (USA)
N	344	154	400	419	100	100
Men/Women	170/174	64/78	243/157	216/203	50/50	33/67
Average Age	58	NI	27	21	43	38
Age Intervals	42-82	18-63	18-60	19-24	19-85	21-67
Technology	Sysmex XN-3000/ FACSCalibur	FACSCalibur/ Sysmex SF-3000	FACSCalibur	FACSCalibur	FACSCalibur/ Advia120	FACSCalibur
Total Lymphocytes (x10³/μL)	1.0 - 2.9	0.5 – 4.2	NI	1.0 - 2.9	1.14 - 3.38	1.2 – 4.2
T Lymphocyte (CD3+)						
Absolute number (Cells/μL)	721.0 - 2316.3	305.4 - 2633.8	743 - 2803	861 - 2571	780 - 2240	983 - 3572
Relative number (%)	59.3 - 84.5	46.2 - 85.7	NI	54.0 - 81.0	53 - 83	65 - 88
Helper T Lymphocyte (CD3+/CD4+)						
Absolute number (Cells/μL)	421.4 - 1549.6	103.5 - 1545.1	380 - 1553	455 - 1536	490 - 1640	491 - 2000
Relative number (%)	32.5 - 61.6	22.18 - 58	NI	29.0 - 53.0	30 - 59	26 - 62
Cytotoxic T Lymphocyte CD3+/CD8+)						
Absolute number (Cells/μL)	175.3 - 893.5	81 - 1019.9	NI	235 - 958	170 - 880	314 - 2087
Relative number (%)	12.3 - 39.1	12.3 - 40.5	NI	14.0 - 36.0	10 - 40	14 - 44
CD4+/CD8+ Ratio	0.8 - 4.2	NI	NI	NI	0.9 - 5.0	0.6 - 4.4
B Lymphocyte (CD19+)						
Absolute number (Cells/μL)	85.2 - 501.6	34.8 - 506.3	NI	NI	80 - 490	64 - 800
Relative number (%)	5.6 - 21.0	4.38 - 29	NI	NI	5 - 21	2 - 27

Natural Killer Cell (NK)						
Absolute number (Cells/ μ L)	83.9 - 423.4	34.8 - 506.3	NI	NI	80 - 690	27 - 693
Relative number (%)	4.3 - 23.5	1.5 - 28.5	NI	NI	5 - 32	2 - 27

Upon comparing our total reference population results with those of other studies, we noticed that the values of total lymphocytes align with those found in Mozambique, differing from the findings in other studies (17,18). The values of T lymphocytes were lower than those found in Morocco [14], Nepal (18) and Mozambique (19). The values for cytotoxic T lymphocytes and B lymphocytes were similar to those reported in Germany, while NK cells exhibited a higher minimum limit compared to the German (20) and Moroccan (17) findings. Furthermore, the reference intervals identified in this study deviate from those observed in other regions of the Americas, such as Peru (22), South Florida [19], and Cuba (15).

In comparison with other Brazilian studies, our study showed lower counts of total lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, and cytotoxic T lymphocytes, see supplementary material Table 8 (23–25). Nevertheless, the comparison is challenging due to the diverse regional, age, and other demographic characteristics among the analyzed populations. Similar regional differences were also reported in India (26), Nepal (18), and China (27).

These variations could be attributed to biological factors like age, gender, and ethnicity (28,29), as well as lifestyle factors encompassing alcohol consumption, smoking, diet, and stress levels (26,30,31). Environmental elements, such as exposure to infectious diseases and socioeconomic factors, might also contribute (17).

Upon comparing the reference ranges of lymphocyte subpopulations by sex, we noted higher counts of T lymphocytes, T helper lymphocytes, and B lymphocytes in women, but lower counts of NK cells. A comparable pattern was observed in another Brazilian study involving individuals from the southern region of Brazil, where women exhibited significantly higher counts of T lymphocytes, helper T cells, and cytotoxic T cells, while men had significantly higher counts of NK cells (24). Elevated counts of these cells in women were also observed in studies conducted in various countries, including Oman (32), Israel (33), Spain (34), and Nepal (18). However, contrasting patterns were observed in other studies. For instance, a study in Iran revealed a higher average percentage of T lymphocytes and helper T lymphocytes in females, with a higher percentage of B lymphocytes in men (35). Similarly, a Chinese study reported higher counts of NK cells in men (27).

These variations, alongside ethnic differences, may be influenced by biological factors. Female sex hormones like estrogen and progesterone, as well as male sex hormones such as testosterone and other androgens, interact with nuclear hormone receptors found in diverse cell types, including immune cells. This interaction modulates a wide array of biological processes, impacting various aspects of the immune system's function (36).

When assessing the potential impact of aging on lymphocyte subpopulations, differences between the adult and elderly groups were observed. In adults, both the absolute and relative values of cytotoxic T lymphocytes and B lymphocytes were notably higher, whereas in the elderly, NK cells were significantly elevated. Similarly, a Chinese study indicated a decrease in the absolute count of T lymphocytes, helper T lymphocytes, and cytotoxic T lymphocytes with aging (37). Numerous studies have highlighted the correlation between age and lymphocyte subpopulations (38).

In a study, a significant decrease in total lymphocytes and B lymphocytes was noted in men aged ≥ 50 years, whereas women aged ≥ 50 years exhibited a reduction in cytotoxic T lymphocytes (32). Criado and colleagues documented a gradual rise in NK cell counts during adulthood, especially in women, and noted a gradual decline in B lymphocytes among the elderly (39).

In our study, although variations were observed, there was no detected need to establish separate reference intervals for the lymphocyte subpopulations across the assessed age groups, possibly because of the narrow age fluctuation of the adult group (42-59 years), as compared to other studies.

The present study exhibits both limitations and strengths. Among its strengths are the large sample size encompassing diverse sociodemographic characteristics, the inclusion of many variables, and the highly standardized assessment of T lymphocyte, B lymphocyte, and NK cell subpopulations. Notably, the study's main strength lies in its reference population, derived from a longitudinal study sample. This differs from existing studies that often include blood donors, a group of exceptionally healthy individuals that doesn't fully mirror the broader Brazilian population. However, our study has limitations related to the age of the population, as it did not include young individuals among the participants. Furthermore, caution must be exercised in generalizing the findings to the entire Brazilian populace, given that ELSA-Brasil

consists of a cohort of public civil servants from urban settings and the analytical sample is limited to a single Brazilian state.

The outcomes from this study underscore the necessity of establishing distinct reference intervals tailored to diverse populations. Furthermore, the observed statistically significant differences in the relative and absolute values of certain lymphocyte subpopulations between genders indicate the potential consideration of separate reference intervals for men and women, notably concerning Helper T Lymphocyte, B lymphocytes and NK cells.

Funding

Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The baseline study of ELSA-Brasil was funded by the Ministry of Health, Department of Science and Technology (DECIT), Ministry of Science and Technology, Financier of Studies and Projects (FINEP) and National Research Council (CNPQ), grants 01 06 0010.00 RS, 01 06 0212.00 BA, 01 06 0300.00 ES, 01 06 0278.00 MG, 01 06 0115.00SP, 01 06 0071.00 RJ.

Author contributions: All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

CRedit authorship contribution statement

Ingrid Caroline Silva Dias: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft. **Chams Bicalho Maluf:** Conceptualization, Methodology. Formal analysis, Writing - Review & Editing, Supervision. **Sandra Guerra Xavier:** Formal analysis, Writing - Review & Editing, Visualization. **Luana Giatti:** Investigation, Resources, Writing - Review & Editing, Funding acquisition. **Sandhi Maria Barreto:** Investigation, Resources, Writing - Review & Editing, Funding acquisition. **Pedro Guatimosim Vidigal:**

Conceptualization, Formal analysis, Writing - Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration.

Competing interests: Authors state no conflict of interest.

References

1. Knight V. The utility of flow cytometry for the diagnosis of primary immunodeficiencies. *Int J Lab Hematol*. 2019;41:63–72. doi: 10.1111/ijlh.13010.
2. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis*. 2020; 221(11):1762-1769. doi: 10.1093/infdis/jiaa150.
3. Yang J, Zhu X, Feng J. The Changes in the Quantity of Lymphocyte Subpopulations during the Process of Sepsis. *Int J Mol Sci*. 2024;25(3):1902. doi: 10.3390/ijms25031902.
4. Bode-Lesniewska B. Flow Cytometry and Effusions in Lymphoproliferative Processes and Other Hematologic Neoplasias. *Acta Cytol*. 2016;60(4):354-364. doi: 10.1159/000448325.
5. Li M, Xu J, Jiang C, Zhang J, Sun T. Predictive and Prognostic Role of Peripheral Blood T-Cell Subsets in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol*. 2022;12. doi: 10.3389/fonc.2022.842705.
6. Kumari D, Singh S, Kumari M, Gupta H, Chauhan D, Singh K, et al. Flow cytometry profiling of cellular immune response in COVID-19 infected, recovered and vaccinated individuals. *Immunobiology*. 228(3):152392. doi: 10.1016/j.imbio.2023.152392.
7. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory. Third Edition. 2008; 2008.
8. Torres AJL, Angelo ALD, Silva MO, Bastos M de C, Souza DF de, Inocencio LA, et al. ESTABLISHING THE REFERENCE RANGE FOR T LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS IN ADULTS AND CHILDREN FROM BRAZIL. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 55(5):323–328. doi: 10.1590/S0036-46652013000500005.
9. Schmidt MI, Duncan BB, Mill JG, Lotufo PA, Chor D, Barreto SM, et al. Cohort profile: Longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil). *Int J Epidemiol*. 44(1):68-75. doi: 10.1093/ije/dyu027.
10. World Health Organization. Active Ageing A Policy Framework. 2022
11. Enawgaw B, Birhan W, Abebe M, Terefe B, Baynes HW, Deressa T, et al. Haematological and immunological reference intervals for adult population in the state of Amhara, Ethiopia. *Tropical Medicine and International Health*. 23(7):765-773. doi: 10.1111/TMI.13071.
12. Harris EK, Boyd JC. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin Chem*. 1990; 36(2):265-70.
13. Rios DRA, Barreto SM, Ferreira LGR, Batista TR, Silva APF, de Oliveira Júnior WV, et al. Performance and reference intervals of thrombin generation test: results from the Brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil). A cross-sectional study. *Sao Paulo Medical Journal*. 2022; 140(3):474-485. doi: 10.1590/1516-3180.2021.0425.r1.07102021.
14. Louati N, Rekik T, Menif H, Gargouri J. Blood lymphocyte T subsets reference values in blood donors by flow cytometry. *Tunis Med*. 2019; 97(2):327-334.
15. Kokuina E, Breff-Fonseca MC, Villegas-Valverde CA, Mora-Díaz I. Normal Values of T, B and NK Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of Healthy Cuban Adults. *MEDICC Rev*. 2019; 21(2-3):16-21. doi: 10.37757/MR2019.V21.N2-3.5.

16. Xu D, Wu Y, Gao C, Qin Y, Zhao X, Liang Z, et al. Characteristics of and reference ranges for peripheral blood lymphocytes and CD4 + T cell subsets in healthy adults in Shanxi Province, North China. *Journal of International Medical Research*. 2020;48(7). doi: 10.1177/0300060520913149.
17. Sahmoudi K, El Allam A, El Fakihi S, Tahoune H, Sadak A, El Hafidi N, et al. Moroccan lymphocyte subsets reference ranges: age, gender, ethnicity, and socio-economic factors dependent differences. *J Immunoassay Immunochem*. 2020; 41(3):281-296. doi: 10.1080/15321819.2020.1728543.
18. Mishra SK, Shrestha L, Pandit R, Khadka S, Shrestha B, Dhital S, et al. Establishment of reference range of CD4 T-lymphocyte in healthy Nepalese adults. *BMC Res Notes*. 2020; 2;13(1):316. doi: 10.1186/s13104-020-05156-5.
19. Cumbane V, Imbach M, Chisumba RM, Macicame I, Eller LA, Lawlor J, Milazzo M, et al. Determining hematological, biochemical and immunological reference values in healthy adults with high-risk for HIV acquisition in Mozambique. *PLoS One*. 2020; 5(4):e0232018. doi: 10.1371/journal.pone.0232018.
20. JENTSCHULLRICH K, KOENIGSMANN M, MOHREN M, FRANKE A. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults—A monocentric German study. *Clinical Immunology*. 2005; 116(2):192-197. doi: 10.1016/j.clim.2005.03.020.
21. Valiathan R, Deeb K, Diamante M, Ashman M, Sachdeva N, Asthana D. Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of South Florida. *Immunobiology*. 2014; 219(7):487-496. doi: 10.1016/j.imbio.2014.02.010.
22. Córdor JM, Álvarez M, Cano L, Matos E, Leiva C, Paredes JA. Intervalos de referencia de subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica en adultos sanos de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2013;30:235–240.
23. Torres AJL, Angelo ALD, Netto EM, Sampaio GP, Souza DFC, Inocêncio LA, et al. Reference range for T lymphocytes populations in blood donors from two different regions in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2009; 13(3):221-225. doi: 10.1590/S1413-86702009000300013.
24. Rudolf-Oliveira RCM, Gonçalves KT, Martignago ML, Mengatto V, Gaspar PC, de Moraes ACR, et al. Determination of lymphocyte subset reference ranges in peripheral blood of healthy adults by a dual-platform flow cytometry method. *Immunol Lett*. 2015; 163(1):96-10. doi: 10.1016/j.imlet.2014.11.003.
25. Morais IRB de, Barbosa D de O, Almeida GB de, Costa RR da, Silva BO da, Oliveira LA de, et al. Determining reference ranges for immunological cells of healthy indigenous individuals from a region in Brazil. *einstein (São Paulo)*. 2023;21. doi: 10.31744/einstein_journal/2023AO0291.
26. Thakar MR, Abraham PR, Arora S, Balakrishnan P, Bandyopadhyay B, Joshi AA, et al. Establishment of reference CD4+ T cell values for adult Indian population. *AIDS Res Ther*. 2011;8:35. doi: 10.1186/1742-6405-8-35.
27. Xu K, Miao L, Chen W, Wu H, Gong Y, Tu X, et al. Establishment of the reference intervals of lymphocyte subsets for healthy Chinese Han adults and its influencing factors. *Ann Transl Med*. 2021; 9(19):1495. doi: 10.21037/atm-21-4031.
28. Xia Y, Liu A, Li W, Liu Y, Zhang G, Ye S, et al. Reference range of naïve T and T memory lymphocyte subsets in peripheral blood of healthy adult. *Clin Exp Immunol*. 2022; 207(2):208-217. doi: 10.1093/cei/uxab038.
29. Saadati Z, Haghshenas M, Rezaeifard S, Heidari F, Erfani N. Reference Ranges of Lymphocyte Subsets in Healthy Individuals from Southern Iran. *Clin Lab*. 2022; 68(10). doi:

10.7754/Clin.Lab.2022.211245.

30. Agarwal D, Paul S, Lele P, Piprode V, Kawade A, Hajela N, et al. Changes in immunological parameters by ageing in rural healthy Indian adults and their associations with sex and lifestyle. *Sci Rep.* 2022; 12(1):15012. doi: 10.1038/s41598-022-19227-z.
31. He W, Ma P, Li X, Wang Y, Zhang Y. Comparison of peripheral blood T, B, and NK lymphocytes between frontline medical workers for treating patients of COVID-19 and normal outpatient and emergency medical workers in China. *Front Psychiatry.* 2023;14. doi: 10.3389/fpsy.2023.1165614.
32. Al-Mawali A, Pinto AD, Al Busaidi R, Al-Zakwani I. Lymphocyte subsets: Reference ranges in an age- and gender-balanced population of Omani healthy adults. *Cytometry Part A.* 2013; 83(8):739-744. doi: 10.1002/cyto.a.22322.
33. Shahal-Zimra Y, Rotem Z, Chezaz J, Shochat T, Ross L, Pickholtz I, et al. Lymphocyte Subset Reference Ranges in Healthy Israeli Adults. *Isr Med Assoc J.* 2016; 18(12):739-743.
34. Andreu-Ballester JC, García-Ballesteros C, Benet-Campos C, Amigó V, Almela-Quilis A, Mayans J, et al. Values for $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-lymphocytes and CD4⁺, CD8⁺, and CD56⁺ subsets in healthy adult subjects: Assessment by age and gender. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012; 82(4):238-244. doi: 10.1002/cyto.b.21020.
35. Kamallou A, Haji Abdolbaghi M, Mohraz M, Rasolinejad M, Karbasi E, Ansaripour B, et al. A. Reference values of lymphocyte sub-populations in healthy human immunodeficiency virus-negative Iranian adults. *Iran J Immunol.* 2014; 11(4):221-232.
36. Shepherd R, Cheung AS, Pang K, Saffery R, Novakovic B. Sexual Dimorphism in Innate Immunity: The Role of Sex Hormones and Epigenetics. *Front Immunol.* 2021;11. doi: 10.3389/fimmu.2020.604000.
37. Wei B, Guo Y, Zhang L, Zhong H, Miao Q, Yan L, et al. Reference ranges of T lymphocyte subsets by single-platform among healthy population in southwest China. *BMC Immunol.* 2021;22(1):80. doi: 10.1186/s12865-021-00474-0.
38. BESCİ Ö, BAŞER D, ÖĞÜLÜR İ, BERBEROĞLU AC, KIYKIM A, BESCİ T, et al. Reference values for T and B lymphocyte subpopulations in Turkish children and adults. *Turk J Med Sci.* 2021;51(4):1814–1824. doi: 10.3906/sag-2010-176.
39. Criado I, Nieto WG, Oliva-Ariza G, Fuentes-Herrero B, Teodosio C, Lecrevisse Q, et al. Age- and Sex-Matched Normal Leukocyte Subset Ranges in the General Population Defined with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST) for Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL) vs. Non-MBL Subjects. *Cancers (Basel).* 2022;15(1):58. doi: 10.3390/cancers15010058.

Supplementary material

Table 8. Comparison of T lymphocyte subsets between populations from regions of Brazil

Study	ELSA-MG	Torres et. al, 2013 [8]	Morais et. al., 2023 [25]	Rudolf-Oliveira et. al, 2015 [24]
Regions of Brazil	Southeast	North, northeast, midwest, southeast and south	Midwest	South
N	344	641	115	238
Men/Women	170/174	403/238	NI	134/104
Average Age	58	33	38	27.3
Age Intervals	42-82	19-56	18-63	16-56
Technology	Sysmex XN-3000/ FACSCalibur	FACSCalibur	FACSCalibur	Sysmex XE 2100D/ FACSCanto II
Total Lymphocytes	1000 - 2900	1257 - 4104	NI	NI
T Lymphocyte (CD3+)				
Absolute number (Cells/ μ L)	721.0 - 2316.3	1025 - 2904	NI	718 – 2494
Relative number (%)	59.3 - 84.5	NI	48.7 - 77.2	51.3 – 83.5
Helper T Lymphocyte (CD3+/CD4+)				
Absolute number (Cells/ μ L)	421.4 - 1549.6	540 - 1731	NI	456 – 1492
Relative number (%)	32.5 - 61.6	NI	18.2 - 49.8	24.4 – 54.2
Cytotoxic T Lymphocyte CD3+/CD8+)				
Absolute number (Cells/ μ L)	175.3 - 893.5	263 - 1189	NI	272 – 1144
Relative number (%)	12.3 - 39.1	NI	12.6 - 34.3	12.8 – 40.2
CD4+/CD8+ Ratio	0.8 - 4.2	NI	NI	0.68 – 3.61

B Lymphocyte (CD19+)				
Absolute number (Cells/ μ L)	85.2 - 501.6	NI	NI	110 – 618
Relative number (%)	5.6 - 21.0	NI	5.4 - 17.7	6.3 – 20.8
Natural Killer Cell (NK)				
Absolute number (Cells/ μ L)	83.9 - 423.4	NI	NI	82 – 760
Relative number (%)	4.3 - 23.5	NI	2.4 - 18.9	3.7 – 28.5

6.2. Artigo 2: Lymphocyte subpopulations: distribution and association with sociodemographic factors, lifestyle, and chronic diseases in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-BRASIL)

Authors: Ingrid Caroline Silva Dias¹;
E-mail: ingrid.carolinee@hotmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8260-1616>

Chams Bicalho Maluf, MD, PhD^{1,2};
E-mail: chams@ufmg.br
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3690-2554>

Rodrigo Alves Pinto, MD³
E-mail: ralvespinto@outlook.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2778-9991>

Sandra Guerra Xavier, MD, PhD²;
E-mail: sandraguerra@ufmg.br
ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0626-8988>

Sandhi M. Barreto, MD, PhD³
E-mail: sandhi.barreto@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7383-7811>

Luana Giatti, MD, PhD³
E-mail: luana.giatti@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5454-2460>

Pedro Guatimosim Vidigal, MD, PhD^{1,2*}
E-mail: pedrovidigal@ufmg.br
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8035-1350>

Affiliation:

Posgraduate Program in Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

Posgraduate Program in Public Health, School of Medicine and EBSERH/Clinical Hospital, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

Corresponding author:

Pedro Guatimosim Vidigal, MD, PhD
E-mail: pedrovidigal@ufmg.br
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8035-1350>

Abbreviations: CD, cluster of differentiation; CD19+, B Lymphocyte; CD3+, T Lymphocyte; CD3+/CD4+, - Helper T Lymphocyte; CD3+/CD8+, Cytotoxic T Lymphocyte; CD3+CD4-CD8-, Double-negative lymphocytes; CLSI, Clinical & Laboratory Standards Institute; COVID-19, Coronavirus Disease; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid, ELSA-Brasil, Brazilian Longitudinal Study of Adult Health, HIV, Human Immunodeficiency Virus, NK, natural killer cells; WHO, World Health Organization

Abstract

Objective: The aim of the study was to evaluate the distribution of lymphocyte subpopulations and their association with lifestyle habits and sociodemographic characteristics in participants of the Longitudinal Study of Adult Health – ELSA-Brasil. **Methods:** The study assessed 480 healthy participants from ELSA-Brasil. Subpopulations of T lymphocytes, helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, B lymphocytes, and natural killer (NK) cells were analyzed using the Sysmex XN-3000 FACSCalibur. We used robust regression analysis to estimate the association of the lymphocyte subpopulation counts with age, sex, body mass index (BMI), smoking, alcohol use, physical activity, diabetes, and hypertension. **Results:** After adjustments, it was shown that with increasing age, there was a reduction in total lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, B lymphocytes, and an increase in NK cells. Women showed an increase in helper T lymphocytes, the helper T lymphocyte/cytotoxic T lymphocyte ratio, B lymphocytes, and a decrease in NK cells. In obesity, there was an increase in total lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, and B lymphocytes. Finally, smoking was associated with an increase in total lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, and B lymphocytes. **Conclusion:** The results suggest that lymphocyte subpopulations can be influenced by sex, age, smoking, and obesity in our population.

Keywords: lymphocyte subpopulations, lifestyle habits, IMC, smoking, flow cytometry

1. Introduction

Many factors affect overall health and the individual's ability to respond to the onset of diseases. Some of these factors are potentially controllable, such as behavioral factors: diet, smoking, physical activity, sleep, alcohol use, and drug consumption. Modifying lifestyle habits brings benefits in disease prevention and progression, as well as contributing to the improvement of quality of life (1–3).

The immune system, both innate and adaptive immunity, can be affected by lifestyle habits, leading to progressive functional impairment and loss of homeostasis. This decline not only implies increased susceptibility to infections, but also to the frequency, incidence, and susceptibility to various diseases such as cancer and autoimmune diseases (4–6). The effects on lymphocytes, a vital part of the immune response, can occur in various types of cells, such as helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, B lymphocytes, and NK cells. Measuring lymphocyte subsets is an essential indicator in the evaluation of cellular and humoral immunity, as it can reflect changes in different factors affecting immune function and homeostasis status (7–9).

Lymphocytes play effector and regulatory roles, and their distribution in peripheral blood can be altered in various conditions. Available evidence suggests that several factors influence lymphocyte subpopulations, such as age, sex, race, socioeconomic status, geography, circadian rhythms, exposure to chemical, physical, and biological agents, and genetic factors. Lifestyle habits such as smoking, alcohol consumption, physical activity, obesity, diet, sleep quality, and medication use can also affect lymphocyte subpopulations in a way that their effects may be long-lasting on the immune system (10–16). Studies in the Brazilian population show the influence of age on lymphocyte subpopulations, with a reduction in total lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, and B lymphocytes as age increases (17,18). Other studies observed that women exhibit an increase in T lymphocytes, helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, B lymphocytes, and a reduction in NK cells (19–21). Smoking is shown to influence the increase in helper T lymphocytes, (22,23) and physical activity is shown to increase regulatory T cells, improving the function of helper T lymphocytes, especially in early immune responses (24,25).

For a better understanding of the impact of different factors on lymphocyte

subpopulations, an assessment was made of aspects related to lifestyle habits, sociodemographic characteristics, and chronic diseases such as diabetes and hypertension, controlling for potential confounding factors. Thus, the objective of the present study was to determine the distribution of absolute values for lymphocyte subpopulations in peripheral blood and evaluate their association with age, sex, BMI, smoking, alcohol use, physical activity, diabetes, and hypertension in an adult Brazilian population.

2. Methods

2.1 Study population

The study population comes from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil), a prospective multicenter and multiethnic study of public civil servants from teaching and research institutions located in six Brazilian states (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, and Rio Grande do Sul). This cross-sectional study comprised a convenience sample of 480 participants from the third study visit of ELSA-Brasil, who underwent data collection at the Minas Gerais Investigation Center. The baseline for ELSA-Brasil took place between 2008 and 2010, the second study visit occurred from 2012 to 2014, and the third study visit spanned from 2016 to 2018. Further details on the study design and cohort profile can be found elsewhere (26).

All 480 participants, aged between 42 and 82 years, underwent blood collection to determine lymphocytes and their respective subpopulations. Demographic variables (gender, age, race), smoking, and alcohol consumption data were retrieved from the ELSA-Brasil Project database.

2.2 Variables

Non-smokers were defined as individuals who never smoked; ex-smokers, individuals who were previously smokers (at least 100 cigarettes in their lifetime) and who do not currently smoke; and smokers were the ones who currently smoke, whether industrialized or electronic cigarettes. Excessive drinkers were defined based on alcohol intake in men ≥ 210 g alcohol/week and in women ≥ 140 g alcohol/week, considering 5% ethanol in the beer composition.

BMI was calculated by BMI: ratio of body weight (kg) to squared height (m²). BMI was divided into 4 categories: thin, eutrophic, overweight and obese. Leisure-time physical activity was assessed using the long version of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) and defined as low (<600 MET min/week), moderate (600–3000 MET-min/week), or vigorous ($\geq$ 3000 METmin/week).

Hypertension was defined as systolic blood pressure $\geq$ 140 mmHg or diastolic blood pressure $\geq$ 90 mmHg or use of antihypertensive medication in the last 2 weeks. The presence of diabetes was defined based on self-reported diabetes by the participant, or use of medication for diabetes in the last 2 weeks or fasting blood glucose $\geq$ 126 mg/dL with fasting time $\geq$ 8h or glycated hemoglobin $\geq$ 6.5% or 2h post-load glucose $\geq$ 200 mg/dL.

2.3 Determination of Lymphocyte Subpopulations

Between December 2017 and April 2018, five milliliters (mL) of venous blood were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes. To minimize circadian variability, venous blood was obtained within the same time-period of the day, between 7:30 and 9:30. Total lymphocyte count of all the subjects was within the reference range (1.000–2.900/ μ L). Samples were stored at room temperature until staining.

Lymphocyte subpopulations were analyzed by dual platform using automated hematological analyzer Sysmex XN-3000 and the four-color flow cytometer on the FACSCalibur.

Total lymphocyte count was measured with an automated hematological analyzer Sysmex XN-3000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Four-color combinations of the following monoclonal antibodies were used: CD45-PerCP/CD3-FITC/CD4-APC/CD8-PE/CD19-APC and CD16+CD56-PE (BD Multitest). 50 μ L of EDTA blood was added to an aliquot of monoclonal antibody as suggested by the manufacturer and incubated for 15 min protected from light at room temperature. After incubation, erythrocytes were lysed with BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company). Samples were then acquired on the flow cytometer.

Staining was always undertaken on the day of sampling, within 4 hours. Four-color-

flow cytometric analysis was performed on FACSCalibur™ flow cytometer (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, USA). Acquisition was run until 20.000 events were detected. Data analyses were made with MultiSET software.

Using the appropriate “gating” approach, the relative frequencies were determined for T-cells (CD3+), T-helper cells (CD3 + CD4+), cytolytic T-cells (CD3 + CD8+), B-cells (CD3 – CD19+), NK-cells (CD3 – CD16+/56+). Since we work with a dual platform, the absolute frequencies of the cell subsets were calculated based on the relative frequencies on total lymphocytes.

Calibration and compensation of the flow cytometer were performed daily using the BD Calibrite™ reagent, as indicated on the package insert. During the calibration process, Time Delay verification, sensitivity testing and voltage adjustment of the photomultiplier (PMTs) were carried out, and report was stored in the instruments. All the calibrators were stored in cold room at controlled temperature.

Total lymphocyte count and relative frequency of lymphocyte subpopulations were determined in the laboratory of the University Hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), which participates in the following external quality control programs - Excellence Program for Medical Laboratories (PELM) of the Brazilian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (SBPC/ML) and United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK NEQAS) - Leucocyte Immunophenotyping.

2.4 Statistical Analysis

The distributions of study variables were summarized using frequency, mean, standard deviation, and median. To evaluate potential deviations from the normal distribution, Skewness, Kurtosis, and Kolmogorov-Smirnov tests were employed.

Outlier identification within each subgroup was conducted using the Dixon and Reed method, commonly referred to as the D/R ratio. Extreme values were omitted from the distribution, if $D/R \geq 1/3$ (27,28).

Robust regression models were used to estimate the magnitude of the association between lymphocyte subpopulations and sociodemographic and lifestyle factors. Robust regression was used, as it is more appropriate for continuous data with outliers and heteroscedasticity.

Univariate robust regression models were built for each lymphocyte subpopulation (response variable): total lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, the helper T lymphocyte/cytotoxic T lymphocyte ratio, B lymphocytes, and NK cells, represented by the raw model (model 0). In the multivariate analysis, variables that showed a significant p-value < 0.05 in the univariate model were included. Three models were established: model 1 was adjusted for age and sex; model 2 was adjusted for all covariates in model 1 plus BMI; and model 3 was adjusted for all covariates in model 2 plus smoking.

All analyzed data were processed using Stata 14.0 software (Stata Corporation, College Station, TX). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

2.5 Ethical Aspects

Biological samples were collected from ELSA-Brasil project participants after obtaining free and informed consent. The ELSA-Brasil project holds approval from the ethics committee (186/06), as well as the third wave of participant assessment (1.901.617).

3. Results

3.1 Sociodemographic and Clinical Data

The sociodemographic characteristics of the participants are shown in Table 1. The population exhibited a female predominance (53.4%) with an average age of 59.6 years, and most identified as White (54.1%). Regarding lifestyle habits and clinical aspects, about 9.1% were smokers, 90.6% did not consume alcohol excessively, 63.1% were engaged in low-intensity physical activity, 24.7% were obese, 42.0% had hypertension, and 17.5% had diabetes.

Table 1. Distribution of sociodemographic characteristics and lifestyle behaviors of the study population

Characteristic	Participants (N=480)
Sex	
Male, N (%)	223 (46.46)
Female, N (%)	257 (53.54)
Mean age $\pm$ SD	59.69 $\pm$ 8.36

Age range	42 – 82
Race	
White, N (%)	260 (54.17)
Black ^a , N (%)	206 (42.92)
Other ^b , N (%)	14 (2.92)
Smoking	
Never smoked, N (%)	301 (62.71)
Ex-smoker, N (%)	135 (28.13)
Current smoker, N (%)	44 (9.17)
Excessive alcohol consumption	
No, N (%)	435 (90.63)
Yes, N (%)	45 (9.38)
Leisure-time physical activity	
Low, N (%)	303 (63.13)
Moderate, N (%)	122 (25.42)
High, N (%)	55 (11.46)
Body mass index (BMI)	
Eutrophy, N (%)	176 (36.67)
Overweight, N (%)	185 (38.54)
Obese, N (%)	119 (24.79)
Hypertension	
No, N (%)	278 (57.92)
Yes, N (%)	202 (42.08)
Diabetes	
No, N (%)	396 (82.50)
Yes, N (%)	84 (17.50)

Abbreviations: N= number of patients; SD= standard deviation

^a Blacks (Blacks and Browns)

^b Others (Asian and Indigenous)

3.2 Univariate and Multivariate Analysis

The univariate analyses showed that with increasing age, there was a reduction in lymphocyte subpopulations, except for NK cells, which increased with age. Women had higher counts of helper T lymphocytes, the helper T lymphocyte/cytotoxic T lymphocyte ratio, and B lymphocytes, whereas men had higher counts of NK cells. Obese individuals had higher counts of total lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, and B lymphocytes. Smokers had higher counts of total lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, and B lymphocytes, while ex-smokers had a lower count of B lymphocytes.

No significant difference was found regarding alcohol consumption. Only moderate-intensity physical activity showed an increase in NK cells. In individuals with diabetes, there was an increase in B lymphocytes and NK cells, while in hypertension, there was an increase in helper T lymphocytes, B lymphocytes, and NK cells.

The data from the univariate analysis are shown in Table 2

Table 2. Univariate analysis of the association between sociodemographic aspects, lifestyle habits, diabetes, and hypertension, and lymphocyte subpopulations

	Total lymphocytes β (IC95%)	T Lymphocyte β (IC95%)	Helper T lymphocyte β (IC95%)	Cytotoxic T lymphocyte β (IC95%)	Helper T lymphocyte/ Cytotoxic T lymphocyte ratio β (IC95%)	B lymphocyte β (IC95%)	Natural Killer Cell β (IC95%)
Age	-0.01 (-0.01 to -0.00)*	-8.47 (-12.96 to -3.97)*	-5.43 (-8.69 to -2.17)*	-3.64 (-5.76 to -1.52)*	0.00 (-0.00 to 0.01)	-2.86 (-3.97 to -1.76)*	1.27 (0.32 to 2.22)*
Sex							
Male (Reference)							
Female	0.08 (-0.00 to 0.17)	75.14 (-1.00 to 151.29)	98.15 (43.73 to 152.56)*	-24.42 (-60.45 to 11.61)	0.32 (0.15 to 0.49)*	39.85 (20.69 to 59.00)*	-23.97 (-39.94 to -8.00)*
BMI							
Eutrophy (Reference)							
Overweight	0.08 (-0.02 to 0.18)	60.47 (-26.84 to 147.79)	44.46 (-18.37 to 107.30)	18.06 (-23.38 to 59.51)	0.00 (-0.19 to 0.20)	8.05 (-14.41 to 30.52)	10.38 (-8.04 to 28.80)
Obese	0.24 (0.12 to 0.36)*	186.47 (88.04 to 284.89)*	145.22 (74.39 to 216.05)*	48.85 (2.13 to 95.57)*	0.12 (-0.09 to 0.35)	32.62 (7.29 to 57.94)*	14.30 (-6.45 to 35.07)
Smoking							
Non-smoker (Reference)							
Ex-smoker	-0.01 (-0.11 to 0.09)	17.14 (-68.68 to 102.97)	19.67 (-41.78 to 81.13)	6.63 (-34.14 to 47.41)	0.02 (-0.16 to 0.22)	-27.02 (-48.47 to -5.57)*	8.87 (-9.21 to 26.95)
Smoker	0.30 (0.14 to 0.46)*	316.41 (182.67 to 450.14)*	257.66 (161.90 to 353.43)*	59.52 (-4.01 to 123.06)	0.26 (-0.04 to 0.57)	51.20 (17.78 to 84.61)*	-14.59 (-42.77 to 13.59)
Excessive drinker							
No (Reference)							
Yes	-0.09 (-0.25 to 0.06)	-59.42 (-190.32 to 71.46)	-21.15 (-116.14 to 73.83)	-44.83 (-106.49 to 16.82)	0.16 (-0.13 to 0.46)	-25.54 (-58.49 to 7.40)	-20.13 (-47.49 to 7.22)
Physical activity							
Weak (Reference)							
Moderate	-0.04 (-0.15 to 0.06)	-45.20 (-135.03 to 44.62)	-21.29 (-86.49 to 43.90)	-29.82 (-71.93 to 12.29)	0.01 (-0.19 to 0.21)	4.59 (-18.09 to 27.29)	-7.25 (-25.83 to 11.32)
Strong	-0.00 (-0.15 to 0.14)	-11.96 (-134.75 to 110.83)	-18.85 (-107.97 to 70.26)	-2.95 (-60.52 to 54.61)	0.02 (-0.25 to 0.30)	4.51 (-26.50 to 35.53)	27.80 (2.40 to 53.20)*
Diabetes							

No (Reference)							
Yes	0.05 (-0.06 to 0.17)	9.29 (-91.18 to 109.77)	9.89 (-63.03 to 82.82)	4.14 (-43.24 to 51.54)	0.09 (-0.13 to 0.32)	32.07 (11.27 to 52.87)*	32.07 (11.27 to 52.87)*
Hypertension							
No (Reference)							
Yes	-0.07 (-0.16 to 0.02)	-68.07 (-145.26 to 9.12)	-65.74 (-121.38 to -10.09)*	-7.73 (-44.23 to 28.76)	-0.10 (-0.28 to 0.06)	-25.38 (-44.81 to -5.96)*	20.18 (4.12 to 36.25)*
* p<0.05							

3.3 Multivariate analysis

Table 3 shows the results of the multivariate analysis adjusted for sociodemographic aspects and lifestyle habits.

Total lymphocytes

After adjustments, we observed that as age increases, total lymphocyte count decreases (β : -0.01, 95% CI: -0.01 to -0.00). However, increases in obesity (β : 0.22, 95% CI: 0.10 to 0.34) and smoking (β : 0.31, 95% CI: 0.15 to 0.47) tend to increase total lymphocyte count. These differences remained in the fully adjusted model (model 3), as shown in Table 3.

T lymphocytes

We observed that increasing age tends to reduce T lymphocyte count (β : -8.58, 95% CI: -13.10 to -4.05). In women (β : 78.57, 95% CI: 3.65 to 153.49), obese individuals (β : 164.14, 95% CI: 67.42 to 260.86), and smokers (β : 325.07, 95% CI: 193.77 to 456.36), T lymphocyte count tends to be higher. These differences remained in the fully adjusted model (model 3), as shown in Table 3.

Helper T lymphocytes

We observed that increasing age tends to reduce helper T lymphocyte count (β : -5.43, 95% CI: -8.61 to -2.26). In women (β : 99.69, 95% CI: 47.12 to 152.26), obese individuals (β : 120.91, 95% CI: 53.04 to 188.78), and smokers (β : 254.47, 95% CI: 162.34 to 346.60), helper T lymphocytes count tends to be higher. These differences remained in the fully adjusted model (model 3), as shown in Table 3. Although hypertension showed a significant difference in the crude model (model 0), this difference was not maintained in the final adjusted model (model 3).

Cytotoxic T lymphocytes

We observed that increasing age tends to reduce cytotoxic T lymphocyte count (β : -5.43, 95% CI: -8.61 to -2.26). These differences remained in the fully adjusted model (model

3), as shown in Table 3. Although obesity showed a significant difference in the crude model (model 0), this difference was not maintained after the final adjustment (model 3).

Helper T lymphocyte/Cytotoxic T lymphocyte ratio

We observed that women have a higher helper T lymphocyte/cytotoxic T lymphocyte ratio compared to men (β : 0.34, 95% CI: 0.16 to 0.51). These differences remained in the fully adjusted model (model 3), as shown in Table 3.

B lymphocytes

In the present study, increasing age tended to reduce the B lymphocyte count (β : -2.70, 95% CI: -3.82 to -1.58). However, being female (β : 38.20, 95% CI: 19.71 to 56.69), obese (β : 35.86, 95% CI: 11.98 to 59.73), and smoker (β : 57.87, 95% CI: 25.46 to 90.28) were associated with higher B lymphocyte counts. These differences remained in the fully adjusted model (model 3), as shown in Table 3. Although ex-smokers, diabetes, and hypertension showed differences in the crude model (model 0), these differences were not maintained after the final adjustment (model 3).

NK Cells

Unlike the other lymphocyte subpopulations, increasing age tended to increase the NK cell count (β : 1.38, 95% CI: 0.41 to 2.36). However, women had a lower count of NK cells compared to men (β : -25.26, 95% CI: -41.40 to -9.11). These differences remained in the fully adjusted model (model 3), as shown in Table 3. Although high-intensity physical activity, diabetes, and hypertension showed differences in the crude model (model 0), these differences were not maintained after the final adjustment (model 3).

Table 3. Multivariate analysis the association between sociodemographic aspects, lifestyle habits and lymphocyte subpopulations

Model	Age β (IC95%)	Female (Ref. male) β (IC95%)	Overweight (Ref. Eutrophy) β (IC95%)	Obese (Ref. Eutrophy) β (IC95%)	Ex-smoker (Ref. Never smoked) β (IC95%)	Smoker (Ref. Never smoked) β (IC95%)
Total lymphocytes						
1	-0.01 (-0.01 to -0.00)*	0.07 (-0.00 to 0.16)				
2	-0.01 (-0.01 to -0.00)*	0.07 (-0.00 to 0.16)	0.08 (-0.02 to 0.18)	0.23 (0.11 to 0.34)*		
3	-0.01 (-0.01 to -0.00)*	0.08 (-0.00 to 0.17)	0.08 (-0.02 to 0.18)	0.22 (0.10 to 0.34)*	0.02 (-0.08 to 0.13)	0.31 (0.15 to 0.47)*
T Lymphocyte						
1	-8.27 (-12.76 to -3.79)*	69.58 (-5.51 to 144.68)				
2	-7.92 (-12.38 to -3.46)*	66.69 (-8.12 to 141.51)	59.38 (-26.69 to 145.47)	174.60 (77.68 to 271.53)*		
3	-8.58 (-13.10 to -4.05)*	78.57 (3.65 to 153.49)*	54.57 (-30.80 to 139.94)	164.14 (67.42 to 260.86)*	50.23 (-36.78 to 137.25)	325.07 (193.77 to 456.36)*
Helper T lymphocyte						
1	-5.15 (-8.35 to -1.95)*	94.06 (40.42 to 147.71)*				
2	-4.88 (-8.05 to -1.71)*	92.35 (39.21 to 145.49)*	42.53 (-18.60 to 103.67)	135.60 (66.75 to 204.44)*		
3	-5.43 (-8.61 to -2.26)*	99.69 (47.12 to 152.26)*	37.64 (-22.26 to 97.55)	120.91 (53.04 to 188.78)*	41.08 (-19.97 to 102.15)	254.47 (162.34 to 346.60)*
Cytotoxic T lymphocyte						
1	-3.69 (-5.81 to -1.57)*	-26.04 (-61.56 to 9.46)				
2	-3.57 (-5.70 to -1.45)*	-26.04 (-61.66 to 9.57)	16.01 (-24.96 to 56.99)	44.73 (-1.40 to 90.88)		
3	-3.80 (-5.97 to -1.62)*	-23.09 (-59.07 to 12.88)	13.71 (-27.28 to 54.71)	41.02 (-5.41 to 87.47)	17.63 (-24.15 to 59.42)	59.80 (-3.24 to 122.85)
Helper T lymphocyte/ Cytotoxic T lymphocyte ratio						
1	0.00 (-0.00 to 0.01)	0.32 (0.15 to 0.49)*				
2	0.00 (-0.00 to 0.01)	0.32 (0.15 to 0.50)*	0.05 (-0.14 to 0.24)	0.13 (-0.08 to 0.35)		
3	0.00 (-0.00 to 0.01)	0.34 (0.16 to 0.51)*	0.05 (-0.14 to 0.24)	0.12 (-0.10 to 0.34)	0.02 (-0.17 to 0.22)	0.29 (-0.00 to 0.60)
B lymphocyte						

1	-2.82 (-3.92 to -1.73)*	37.77 (19.39 to 56.14)*				
2	-2.86 (-3.97 to -1.76)*	38.11 (19.57 to 56.65)*	10.20 (-11.12 to 31.53)	33.94 (9.92 to 57.96)*		
3	-2.70 (-3.82 to -1.58)*	38.20 (19.71 to 56.69)*	10.99 (-10.08 to 32.06)	35.86 (11.98 to 59.73)*	-12.46 (-33.94 to 9.02)	57.87 (25.46 to 90.28)*
Natural Killer Cell						
1	1.27 (0.32 to 2.22)*	-23.37 (-39.27 to -7.46)*				
2	1.31 (0.36 to 2.26)*	-23.31 (-39.25 to -7.37)*	10.26 (-8.07 to 28.60)	14.84 (-5.80 to 35.49)		
3	1.38 (0.41 to 2.36)*	-25.26 (-41.40 to -9.11)*	11.15 (-7.24 to 29.55)	15.65 (-5.19 to 36.50)	-3.81 (-22.56 to 14.94)	-24.05 (-52.35 to 4.24)

Model 1: Age and sex

Model 2: Age, sex and BMI

Model 3: Age, sex, BMI and smoking

* p<0.05

4. Discussion

In this study, we evaluated the relationship between total lymphocytes, and lymphocytes subpopulations with age, gender, BMI, smoking, alcohol consumption, physical activity, diabetes, and hypertension.

Age

Our results suggest that increasing age is associated with a reduction in lymphocyte subpopulations, except for the NK cells. The helper T lymphocyte/cytotoxic T lymphocyte ratio does not seem to be impacted by increasing age. Our results align with previous studies that support evidence suggesting that both aging and the increase in age are associated with a reduction in immune system cells, in a process known as immunosenescence (29–31). One of the most pronounced characteristics of immunosenescence is the substantial decrease in naïve helper T lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes, as well as the reduction in their differentiation into memory cells (32,33).

Innate immunity is also affected by age-related changes, with an increase in the number of NK cells in older adults. However, this increase appears to be accompanied by a reduction in their cytotoxicity. The increase in the number of NK cells may be a compensatory mechanism to counterbalance their functional decline (34,35). With increasing age, there is a change in the expression of natural cytotoxicity receptors (NCRs) NKp30 and NKp46, and effector functions are reduced, with lower expression of perforin and granzyme, as well as reduced secretion of IFN- α and IFN- γ . These actions can impair the immune surveillance function of NK cells (32,33,36).

Sex

Women had more cells than men, with higher T lymphocyte, helper T lymphocyte, and B lymphocyte counts, as well as a higher helper T lymphocyte/cytotoxic T lymphocyte ratio. On the other hand, the NK cell count was higher in men. Similar results in women were found in studies conducted in Uganda (37) and China (38), which showed an increase in helper T lymphocytes and the helper T lymphocyte/cytotoxic T lymphocyte ratio. In the male population, studies conducted in Qatar (39) and Israel (40) showed an increase in cytotoxic T lymphocytes and NK cells, while studies in Iran (41) and Poland (42) reported an increase in

B lymphocytes.

The sex-related differences observed in the immune system can be explained by two main factors: the influence of sex hormones and differences in the number of immune-related genes on the X chromosome (43).

The estrogen receptors (ER- α and ER- β), progesterone receptor (PR), and androgen (primarily represented by testosterone) receptor (AR), are expressed by a variety of immune cells, including T lymphocytes, B lymphocytes, dendritic cells, monocytes, macrophages, and NK cells. In general, estrogen has immune-stimulatory effects on the adaptive immune system, including an increase in B lymphocytes, although it also increases the number and function of regulatory T lymphocytes (Treg). Androgens impact adaptive immune responses and can inhibit both humoral and cellular immune responses, reducing the proliferation of T and B lymphocytes, as well as the production of immunoglobulin and cytokines. Regarding B lymphocytes, androgens have inhibitory effects on lymphopoiesis and specifically affect the production of B lymphocyte precursors that express the androgen receptor (44–46).

The X chromosome contains about 50 immune-related genes, including some important for immune cell identity (FOXP3), cell activation and intracellular signaling (CD40LG, TLR7, IRAK1, IL13RA1/2, NEMO, TASL, IL-9R), leukocyte trafficking (CD99, CXCR3), immune cell differentiation and proliferation (IL-2RG, BTK), and cellular metabolism (OGT, CYBB). Therefore, the X chromosome is likely a key contributor to the molecular basis of sex-related immune responses (45).

BMI

Our results show that in obesity, there is an increase in total lymphocyte, T lymphocyte, helper T lymphocyte, and B lymphocyte counts. These results are consistent with studies from the Women's Interagency HIV Study (WIHS), which investigated the longitudinal relationship between BMI and lymphocyte subpopulations in 322 women with an average age of 35 years. This study demonstrated that total lymphocytes, helper T lymphocytes, and cytotoxic T lymphocytes were elevated in the blood of women with obesity and were positively correlated with BMI. Additionally, the associations between weight and immune cell counts became stronger with each successive increase to the next BMI category (47).

Another recent study examined the phenotypic characteristics of peripheral blood lymphocytes and their correlations with body composition in apparently healthy young adults. It reported that B lymphocytes were increased in the obese group and were positively correlated with other adiposity indices such as waist-to-hip ratio, waist-to-height ratio, total body fat mass, and visceral fat level (48).

Studies have shown that although weight loss improves the metabolic profile, changes in the immune system may persist for some time. In obese individuals who underwent bariatric surgery, the effect of weight loss on T lymphocytes, the improvement of immune cell imbalance in peripheral blood, and the return of the immune cell ratio to normal levels were only observed 12 months after the surgery (49,50).

Obesity is accompanied by chronic low-grade inflammation in metabolically important tissues such as adipose tissue, liver, skeletal muscle, pancreatic islets, and brain. The main changes in immune responses are related to the activation of pro-inflammatory mechanisms.

The pro-inflammatory cytokines overexpressed in obesity are considered the link between obesity and inflammation. The increased secretion of cytokines produced by adipocytes, such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, leptin, and resistin, along with the concomitant reduction of IL-10 and adiponectin, characterize obesity as a low-grade inflammatory state (51). This process also induces the recruitment of other cells such as helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, NK cells, and the proportional reduction in the frequency of regulatory T cells.

This scenario contributes to the production of pro-inflammatory cytokines, the release of chemokines such as monocyte chemoattractant proteins 1 and 3 (MCP-1 and MCP-3), and creates a positive feedback loop of continuous cellular recruitment with constant inflammation, thereby stimulating the inflammatory state of obesity (52,53).

To our knowledge, there is no other study in Brazil that has evaluated the association between lymphocytes with BMI. Thus, the impact of BMI on lymphocyte subpopulations presented in this work may contribute to a better understanding of the effects of obesity in immune system changes in our population.

Smoking

Smokers have higher total lymphocyte counts, T lymphocytes, helper T lymphocytes, and B lymphocytes. Similar results were reported in a study that evaluated the effects of smoking on circulating leukocytes and plasma cytokines in monozygotic twins, where one was a smoker and the other was a non-smoker, aiming to assess variability due to genetic history. The study indicated that the smoker showed elevated T lymphocyte, helper T lymphocyte, and B lymphocyte counts, along with a reduction in NK cells, suggesting that smokers have increased adaptive immune system cell counts and decreased innate immune system cell counts (54).

Moreover, another study indicated that lymphocytes can be influenced by smoking independently of the degree (light, moderate, or heavy). It was observed that in light to moderate smokers, there were significantly higher total lymphocyte, T lymphocyte, and helper T lymphocyte counts compared to non-smokers. Heavy smokers, on the other hand, showed significantly higher helper T lymphocytes counts compared to light and moderate smokers, suggesting a greater susceptibility of this subpopulation to the effects of smoking (55).

This finding can be explained by evidence showing that dendritic cells in the lungs, when exposed to cigarette smoke, become activated and start stimulating T lymphocytes. The act of smoking alters the production of extracellular vesicles by dendritic cells, and this alteration can lead to the differentiation of T lymphocytes towards a pro-inflammatory profile (56).

Moreover, the increase in leukocytes in smokers may be associated with nicotine, as its effect on the adrenal medulla leads to the release of catecholamines, which can increase the leukocyte count by altering the distribution of these leukocytes from the marginal pool (located at the periphery of blood vessels) to the circulating pool (in the bloodstream). Additionally, free radicals produced by cigarette smoke are correlated with various inflammatory markers, such as C-reactive protein. Another hypothesis suggests that cigarette smoke directly stimulates the production of leukocytes via the bone marrow, altering not only leukocytes but also general hematological parameters (57).

The duration of tobacco exposure may also influence lymphocyte counts, with chronic nicotine exposure affecting T lymphocyte proliferation in peripheral blood and the spleen, while acute nicotine exposure is restricted to peripheral blood. This suggests that nicotine may trigger different mechanisms depending on the levels of exposure (58).

In addition to nicotine, cigarette smoke contains other components such as polycyclic aromatic hydrocarbons, tobacco glycoproteins, tar, and heavy metals. Tobacco glycoproteins, tar, and heavy metals, along with nicotine, have immunostimulatory activity, which may partly explain the increase in lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of smokers. It is important to note that this immunostimulatory activity can promote an inflammatory microenvironment or even a tumorigenic one (59).

Alcohol consumption

Our study did not find significant differences between excessive drinkers and non-excessive drinkers regarding lymphocyte subpopulations. However, some studies have shown that individuals who consume alcohol exhibit a reduction in B lymphocytes and double-negative lymphocytes, along with an increase in helper T lymphocytes (60,61). The conflicting results regarding the influence of alcohol on lymphocyte subpopulations may be attributed to factors such as differences in the definitions of alcohol use. Some studies rely on self-reports, and immune system alterations may vary depending on the patterns of alcohol consumption (62). Acute exposure to high doses of alcohol tends to inhibit immune cells, while long-term exposure stimulates the production of pro-inflammatory cytokines (63).

Physical activity

Our study found no significant differences in the lymphocyte subpopulations between individuals who engage in physical activity at different intensities. The literature reports the benefits of physical activity on the immune system, such as an increase in helper T cells, cytotoxic T cells, and improved differentiation of regulatory T cells. Additionally, physical activity enhances the functionality of T lymphocytes and reduces the presence of senescent T cells (9,64–66). Differences in the characteristics of the studied populations may at least partially explain the findings, such as the presence of comorbidities and other prevalent conditions in the Brazilian population.

Diabetes and hypertension

The presence of diabetes and hypertension showed differences in some lymphocyte subpopulations in the univariate analysis; however, these differences did not remain after adjustments in the final model. A study evaluating type 2 diabetes patients in Saudi Arabia found a lower percentage of total lymphocytes, T lymphocytes, helper T lymphocytes, NK cells, and a higher percentage of B lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes in diabetic patients. However, this study assessed the proportion of lymphocyte subpopulations, which differs from our study that evaluated absolute counts (64). Another study conducted in Korea evaluated NK cell activity in diabetic, pre-diabetic, and healthy individuals, while our study focused only on diabetic and healthy individuals, specifically assessing the NK cell count (65).

The multi-ethnic atherosclerosis study (MESA) demonstrated that higher naïve and memory T-helper lymphocyte counts are associated with a higher likelihood of diabetes. However, this study did not assess the oral glucose tolerance test (OGTT) for diabetes evaluation, meaning that participants with diabetes might have been misclassified as normal. Additionally, there was not control for potential confounders, such as smoking, which could have influenced the results (66).

The MESA study also evaluated lymphocyte subpopulations in hypertension and found that an increase in NK cells was associated with higher blood pressure, but no associations were found with adaptive immune cells. However, the MESA study used blood pressure measurements over a 10-year period, and lymphocyte subpopulations were obtained using the Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) technique with cryopreserved samples, which could result in different absolute levels of some subsets compared to total blood (67). The literature indicates that immune system cells, particularly T lymphocytes and monocytes, are recruited to the perivascular space, exacerbating fibrosis and vascular dysfunction, ultimately leading to increased blood pressure and damage to target organs such as the kidneys and heart (68). However, these mechanisms have predominantly been identified and described in animal models, making it difficult to extrapolate them to studies involving humans (69).

Discrepant results between our study and others may be explained by differences in study design, as our study is cross-sectional and did not compare participants longitudinally. The sample size also varies between studies, as do demographic differences in lifestyle habits.

The use of different methods to assess lymphocyte subpopulations is another factor, as we used total blood samples while some studies assessed PBMC samples. Furthermore, as we measured lymphocyte populations in peripheral blood, our null results may not reflect the involvement of lymphocyte subsets located in specific tissues, such as adipose tissue or skeletal muscle, in relation to lifestyle habits.

This study has limitations and strengths. One limitation is related to the age of the population, as young individuals were not included among the participants. Additionally, we did not have data on the duration of smoking in smokers or the length of smoking cessation in former smokers. However, our study has notable strengths that deserve mention. First, the sample size, which includes a wide range of sociodemographic characteristics, the inclusion of many variables, and the highly standardized assessment of T lymphocytes, B lymphocytes, and NK cells. Second, the adjustments for potential confounding factors, which are often not considered in other studies.

5. Conclusion

The results of this study highlight the impact of aging and sex on the immune system. Additionally, the observed differences in certain lymphocyte subpopulations in relation to lifestyle habits, such as obesity and smoking, suggest that the immune system undergoes various alterations due to these habits. These immune changes may also contribute as a risk factor for a constellation of infectious diseases and chronic conditions, including cardiovascular diseases, type 2 diabetes, and cancer.

Funding

Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The baseline study of ELSA-Brasil was funded by the Ministry of Health, Department of Science and Technology (DECIT), Ministry of Science and Technology, Financier of Studies and Projects (FINEP) and National Research Council (CNPQ), grants 01 06 0010.00 RS, 01 06 0212.00 BA, 01 06 0300.00 ES, 01 06 0278.00 MG, 01 06 0115.00SP, 01 06 0071.00 RJ.

Competing interests: Authors state no conflict of interest.

References

1. Tomba E. Assessment of Lifestyle in Relation to Health. In 2012. p. 72–96.
2. Oster H, Chaves I. Effects of Healthy Lifestyles on Chronic Diseases: Diet, Sleep and Exercise. *Nutrients*. 2023 Oct 31;15(21):4627.
3. Patrão AL, Almeida M da CC, Alvim S, Chor D, Aquino EML. Health behavior-related indicator of lifestyle: application in the ELSA-Brasil study. *Glob Health Promot*. 2019 Dec 11;26(4):62–9.
4. de Frel DL, Atsma DE, Pijl H, Seidell JC, Leenen PJM, Dik WA, et al. The Impact of Obesity and Lifestyle on the Immune System and Susceptibility to Infections Such as COVID-19. *Front Nutr*. 2020 Nov 19;7.
5. Divella R, Marino G, Infusino S, Lanotte L, Gadaleta-Caldarola G, Gadaleta-Caldarola G. The Mediterranean Lifestyle to Contrast Low-Grade Inflammation Behavior in Cancer. *Nutrients*. 2023 Mar 29;15(7):1667.
6. Janssen H, Koekkoek LL, Swirski FK. Effects of lifestyle factors on leukocytes in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2023 Sep 26;
7. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2020 Jul 16;17(7):387–401.
8. Laera N, Malerba P, Vacanti G, Nardin S, Pagnesi M, Nardin M. Impact of Immunity on Coronary Artery Disease: An Updated Pathogenic Interplay and Potential Therapeutic Strategies. *Life*. 2023 Oct 27;13(11):2128.
9. Tylutka A, Morawin B, Gramacki A, Zembron-Lacny A. Lifestyle exercise attenuates immunosenescence; flow cytometry analysis. *BMC Geriatr*. 2021 Dec 22;21(1):200.
10. Tosato F, Bernardi D, Sanzari MC, Pantano G, Plebani M. Biological variability of lymphocyte subsets of human adults' blood. *Clinica Chimica Acta*. 2013 Sep;424:159–63.
11. García-Dabrio MC, Pujol-Moix N, Martínez-Perez Á, Fontcuberta J, Souto JC, Soria JM, et al. Influence of Age, Gender and Lifestyle in Lymphocyte Subsets: Report from the Spanish Gait-2 Study. *Acta Haematol*. 2012;127(4):244–9.
12. Swaby A, Atallah A, Varol O, Cristea A, Quail DF. Lifestyle and host determinants of antitumor immunity and cancer health disparities. *Trends Cancer*. 2023 Dec;9(12):1019–40.
13. Farrell CJL, Nguyen L. Indirect Reference Intervals: Harnessing the Power of Stored Laboratory Data. *Clin Biochem Rev [Internet]*. 2019 May;40(2):99–111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31205377>
14. Rosenfeld LG, Malta DC, Szwarcwald CL, Bacal NS, Cuder MAM, Pereira CA, et al. Valores de referência para exames laboratoriais de hemograma da população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2019;22(suppl 2).
15. Grievink HW, Smit V, Huisman BW, Gal P, Yavuz Y, Klerks C, et al. Cardiovascular risk factors: The effects of ageing and smoking on the immune system, an observational clinical study. *Front Immunol*. 2022 Sep 15;13.
16. Soporì M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002 May;2(5):372–7.
17. Moraes-Pinto MI de, Ono E, Santos-Valente EC, Almeida LC, Andrade PR de, Dinelli MIS, et al. Lymphocyte subsets in human immunodeficiency virus-unexposed Brazilian individuals from birth to adulthood. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Nov 21;109(8):989–98.
18. Lopes AB, Lopes LB, da Silveira Antunes RN, Fukasawa JT, de A. Cavaretto D, Calamita Z. Effects of Immunosenescence on the Lower Expression of Surface Molecules in

Neutrophils and Lymphocytes. *Curr Aging Sci*. 2019 Feb 7;11(2):118–25.

19. Rudolf-Oliveira RCM, Gonçalves KT, Martignago ML, Mengatto V, Gaspar PC, de Moraes ACR, et al. Determination of lymphocyte subset reference ranges in peripheral blood of healthy adults by a dual-platform flow cytometry method. *Immunol Lett*. 2015 Jan;163(1):96–101.

20. TORRES AJL, CISNEIROS P, GUEDES R, GRASSI MFR, MEYER R, BENDICHO MT, et al. Lymphocyte subset reference intervals in blood donors from northeastern Brazil. *An Acad Bras Cienc*. 2015 Apr 28;87(2):1019–25.

21. Morais IRB de, Barbosa D de O, Almeida GB de, Costa RR da, Silva BO da, Oliveira LA de, et al. Determining reference ranges for immunological cells of healthy indigenous individuals from a region in Brazil. *einstein (São Paulo)*. 2023 Oct 11;21.

22. Torres AJL, Angelo ALD, Silva MO, Bastos M de C, Souza DF de, Inocencio LA, et al. ESTABLISHING THE REFERENCE RANGE FOR T LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS IN ADULTS AND CHILDREN FROM BRAZIL. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2013 Sep;55(5):323–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652013000500323&lng=en&tlng=en

23. Torres AJL, Angelo ALD, Netto EM, Sampaio GP, Souza DFC, Inocência LA, et al. Reference range for T lymphocytes populations in blood donors from two different regions in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2009 Jun;13(3):221–5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702009000300013&lng=en&nrm=iso&tlng=en

24. Fernandes JR, Marques da Silva CCB, da Silva AG, de Carvalho Pinto RM, da Silva Duarte AJ, Carvalho CR, et al. Effect of an Exercise Program on Lymphocyte Proliferative Responses of COPD Patients. *Lung*. 2018 Jun 10;196(3):271–6.

25. Passos MEP, Borges L, dos Santos-Oliveira LC, Alecrim-Zeza AL, Lobato TB, de Oliveira HH, et al. Recreational Dance Practice Modulates Lymphocyte Profile and Function in Diabetic Women. *Int J Sports Med*. 2021 Jun 15;42(08):749–59.

26. Schmidt MI, Duncan BB, Mill JG, Lotufo PA, Chor D, Barreto SM, et al. Cohort profile: Longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil). *Int J Epidemiol*. 2015 Feb 1;44(1):68–75.

27. Enawgaw B, Birhan W, Abebe M, Terefe B, Baynes HW, Deressa T, et al. Haematological and immunological reference intervals for adult population in the state of Amhara, Ethiopia. *Tropical Medicine and International Health*. 2018 Jul 1;23(7):765–73.

28. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory. Third Edition. 2008; 2008. 1–72 p.

29. Chang ST, Chuang YF, Li AH, Fan YT, Liao MR, Chen IY, et al. Age-dependent immune profile in healthy individuals: an original study, systematic review and meta-analysis. *Immunity & Ageing*. 2024 Oct 29;21(1):75.

30. Thyagarajan B, Faul J, Vivek S, Kim JK, Nikolich-Zugich J, Weir D, et al. Age-Related Differences in T-Cell Subsets in a Nationally Representative Sample of People Older Than Age 55: Findings From the Health and Retirement Study. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2022 May 5;77(5):927–33.

31. Sun H, Kang X, Chen X, Cai L, Li Y, Yu J, et al. Immunosenescence evaluation of peripheral blood lymphocyte subsets in 957 healthy adults from 20 to 95 years old. *Exp Gerontol*. 2022 Jan;157:111615.

32. Ligotti ME, Aiello A, Accardi G, Aprile S, Bonura F, Bulati M, et al. Analysis of T and NK cell subsets in the Sicilian population from young to supercentenarian: The role of age and gender. *Clin Exp Immunol*. 2021 Jul 12;205(2):198–212.

33. Caruso C, Ligotti ME, Accardi G, Aiello A, Candore G. An immunologist's guide to

- immunosenescence and its treatment. *Expert Rev Clin Immunol*. 2022 Sep 2;18(9):961–81.
- 34.Phan MT, Chun S, Kim SH, Ali AK, Lee SH, Kim S, et al. Natural killer cell subsets and receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of a healthy Korean population: Reference range, influence of age and sex, and correlation between NK cell receptors and cytotoxicity. *Hum Immunol*. 2017 Feb;78(2):103–12.
- 35.Reed RG, Al-Attar A, Presnell SR, Lutz CT, Segerstrom SC. A longitudinal study of the stability, variability, and interdependencies among late-differentiated T and NK cell subsets in older adults. *Exp Gerontol*. 2019 Jul;121:46–54.
- 36.Aiello A, Farzaneh F, Candore G, Caruso C, Davinelli S, Gambino CM, et al. Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention. *Front Immunol*. 2019 Sep 25;10.
- 37.Naluyima P, Eller LA, Ouma BJ, Kyabaggu D, Kataaha P, Guwatudde D, et al. Sex and Urbanicity Contribute to Variation in Lymphocyte Distribution across Ugandan Populations. *PLoS One*. 2016 Jan 5;11(1):e0146196.
- 38.Xu D, Wu Y, Gao C, Qin Y, Zhao X, Liang Z, et al. Characteristics of and reference ranges for peripheral blood lymphocytes and CD4 + T cell subsets in healthy adults in Shanxi Province, North China. *Journal of International Medical Research*. 2020 Jul 10;48(7).
- 39.Al-Thani A, Hamdi WS, Al-Marwani A, Alnaqdy A, Sharafeldin H. Reference Ranges of Lymphocyte Subsets in Healthy Qatari Adults. *Biomark Med*. 2015 May 2;9(5):443–52.
- 40.Shahal-Zimra Y, Rotem Z, Chezar J, Shochat T, Ross L, Pickholtz I, et al. Lymphocyte Subset Reference Ranges in Healthy Israeli Adults. *Isr Med Assoc J*. 2016 Dec;18(12):739–43.
- 41.Kamallou A, Haji Abdolbaghi M, Mohraz M, Rasolinejad M, Karbasi E, Ansaripour B, et al. Reference values of lymphocyte sub-populations in healthy human immunodeficiency virus-negative Iranian adults. *Iran J Immunol*. 2014 Dec;11(4):221–32.
- 42.Roszczyk A, Zych M, Sołdacki D, Zagózdzon R, Kniotek MJ. Reference values of lymphocyte subsets from healthy Polish adults. *Central European Journal of Immunology*. 2024;49(1):26–36.
- 43.Fritz García JHG, Keller Valsecchi CI, Basilicata MF. Sex as a biological variable in ageing: insights and perspectives on the molecular and cellular hallmarks. *Open Biol*. 2024 Oct 30;14(10).
- 44.Lai JJ, Lai KP, Zeng W, Chuang KH, Altuwaijri S, Chang C. Androgen Receptor Influences on Body Defense System via Modulation of Innate and Adaptive Immune Systems. *Am J Pathol*. 2012 Nov;181(5):1504–12.
- 45.Forsyth KS, Jiwrajka N, Lovell CD, Toothacre NE, Anguera MC. The connexion between sex and immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2024 Jul 21;24(7):487–502.
- 46.Sakkas LI, Chikanza IC. Sex bias in immune response: it is time to include the sex variable in studies of autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatol Int*. 2023 Sep 16;44(2):203–9.
- 47.Womack J, Tien PC, Feldman J, Shin JH, Fennie K, Anastos K, et al. Obesity and immune cell counts in women. *Metabolism*. 2007 Jul;56(7):998–1004.
- 48.Kosovski IB, Ciurea CN, Ghiga D, Ciurea NA, Huțanu A, Gliga FI, et al. Characterizing Human Peripheral Blood Lymphocyte Phenotypes and Their Correlations with Body Composition in Normal-Weight, Overweight, and Obese Healthy Young Adults. *Medicina (B Aires)*. 2024 Sep 18;60(9):1523.
- 49.Barbosa P, Pinho A, Lázaro A, Paula D, Tralhão JG, Paiva A, et al. Bariatric Surgery Induces Alterations in the Immune Profile of Peripheral Blood T Cells. *Biomolecules*. 2024 Feb 12;14(2):219.
- 50.Zhang J, Chen X, Liu W, Zhang C, Xiang Y, Liu S, et al. Metabolic surgery improves the unbalanced proportion of peripheral blood myeloid dendritic cells and T lymphocytes in obese

patients. *Eur J Endocrinol*. 2021 Dec 1;185(6):819–29.

51.Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y. Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Archives of Medical Science*. 2017;4:851–63.

52.Schleh MW, Caslin HL, Garcia JN, Mashayekhi M, Srivastava G, Bradley AB, et al. Metaflammation in obesity and its therapeutic targeting. *Sci Transl Med*. 2023 Nov 22;15(723).

53.Andersen CJ, Murphy KE, Fernandez ML. Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity. *Advances in Nutrition*. 2016 Jan;7(1):66–75.

54.Andreoli C, Bassi A, Gregg EO, Nunziata A, Puntoni R, Corsini E. Effects of cigarette smoking on circulating leukocytes and plasma cytokines in monozygotic twins. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2015 Jan 1;53(1).

55.Tanigawa T, Araki S, Nakata A, Kitamura F, Yasumoto M, Sakurai S, et al. Increase in Memory (CD4+CD29+ and CD4+CD45RO+) T and Naive (CD4+CD45RA+)T-Cell Subpopulations in Smokers. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 1998 Nov 1;53(6):378–83.

56.Russell AE, Liao Z, Tkach M, Tarwater PM, Ostrowski M, Théry C, et al. Cigarette smoke-induced extracellular vesicles from dendritic cells alter T-cell activation and HIV replication. *Toxicol Lett*. 2022 May;360:33–43.

57.Shakiba E, Moradinazar M, Rahimi Z, Najafi F, Pasdar Y, Kohsari M. Tobacco smoking and blood parameters in the kurdis population of Iran. *BMC Cardiovasc Disord*. 2023 Aug 14;23(1):401.

58.Giusti AL. Interferência do tabaco no sistema imunitário – estado atual e perspectivas – revisão da literatura. *ConScientiae Saúde*. 2008 Apr 7;6(1):155–64.

59.Liu Y, Lu L, Yang H, Wu X, Luo X, Shen J, et al. Dysregulation of immunity by cigarette smoking promotes inflammation and cancer: A review. *Environmental Pollution*. 2023 Dec;339:122730.

60.García-Dabrio MC, Pujol-Moix N, Martinez-Perez Á, Fontcuberta J, Souto JC, Soria JM, et al. Influence of Age, Gender and Lifestyle in Lymphocyte Subsets: Report from the Spanish Gait-2 Study. *Acta Haematol*. 2012;127(4):244–9.

61.Capasso A, Brown JL, Safonova P, Belyakov N, Rassokhin V, DiClemente RJ. Heavy Alcohol Use is Associated with Lower CD4 Counts among Russian Women Living with HIV: A Multilevel Analysis. *AIDS Behav*. 2021 Nov 20;25(11):3734–42.

62.Mili F, Flanders WD, Boring JR, Annett JL, DeStefano F. The Associations of Alcohol Drinking and Drinking Cessation to Measures of the Immune System in Middle-Aged Men. *Alcohol Clin Exp Res*. 1992 Aug 11;16(4):688–94.

63.Barr T, Helms C, Grant K, Messaoudi I. Opposing effects of alcohol on the immune system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016 Feb;65:242–51.

64.Allahyani M, Alshalawi AM, Alshalawii MR, Alqorashi SA, Aljuaid A, Almeahmadi MM, et al. Phenotypical evaluation of lymphocytes and monocytes in patients with type 2 diabetes mellitus in Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2023 Mar 20;44(3):296–305.

65.Kim JH, Park K, Lee SB, Kang S, Park JS, Ahn CW, et al. Relationship between natural killer cell activity and glucose control in patients with type 2 diabetes and prediabetes. *J Diabetes Investig*. 2019 Sep 5;10(5):1223–8.

66.Olson NC, Doyle MF, Sitlani CM, de Boer IH, Rich SS, Huber SA, et al. Associations of Innate and Adaptive Immune Cell Subsets With Incident Type 2 Diabetes Risk: The MESA Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Mar 1;105(3):e848–57.

67.Delaney JAC, Olson NC, Sitlani CM, Fohner AE, Huber SA, Landay AL, et al. Natural killer cells, gamma delta T cells and classical monocytes are associated with systolic blood pressure in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *BMC Cardiovasc Disord*. 2021

Dec 22;21(1):45.

68.Benson LN, Guo Y, Deck K, Mora C, Liu Y, Mu S. The link between immunity and hypertension in the kidney and heart. *Front Cardiovasc Med*. 2023 Mar 9;10.

69.Siedlinski M, Jozefczuk E, Xu X, Teumer A, Evangelou E, Schnabel RB, et al. White Blood Cells and Blood Pressure. *Circulation*. 2020 Apr 21;141(16):1307–17.

Author contributions: All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

6.3. Depressão e ansiedade

As características de saúde mental da nossa população estão representadas na Tabela 4. 17.66% dos participantes foram identificados com depressão e 15.38% ansiedade.

Tabela 4. Distribuição de depressão e ansiedade na população do estudo

Característica	Participantes (N=351)
Depressão*	
Não, N (%)	282 (80.34)
Sim, N (%)	62 (17.66)
Ansiedade*	
Não, N (%)	290 (82.62)
Sim, N (%)	54 (15.38)

N, número de pacientes; DPM, desvio-padrão da média

*A soma das observações pode diferir em algumas variáveis devido a dados faltantes

Indivíduos com depressão apresentaram aumento significativo nos valores relativos de linfócitos T ($p=0.0215$) e linfócitos T auxiliares ($p=0.0109$), porém, apresentaram menor valor absoluto e relativo de células NK ($p=0.0073$, $p=0.0115$ respectivamente), conforme demonstrado na Tabela 5.

Indivíduos com ansiedade não apresentaram alteração significativa nos valores das subpopulações de linfócitos, conforme demonstrado na Tabela 6.

Em indivíduos com depressão foi observado um aumento na contagem relativa de linfócitos T e linfócitos T auxiliares, além de uma redução na contagem absoluta e relativa de células NK.

Tabela 5. Contagem de linfócitos totais e subpopulações de linfócitos em participantes com depressão

Parâmetro	Mediana (P25 - P75)		ValorP†
	Com depressão (N=62)	Sem depressão (N=282)	
Linfócitos totais (x10³/μL)	1.8 (1.5 - 2.1)	1.7 (1.4 - 2.1)	0.6696
Linfócito T (CD3+)			
Número absoluto (Cells/μL)	1378.6 (1133.9 - 1677.3)	1318.2 (1052.8 - 1629.3)	0.3280
Número relativo (%)	75.4 (71.9 - 79.0)	73.2 (68.9 - 77.6)	0.0215
Linfócito T auxiliar (CD3+/CD4+)			
Número absoluto (Cells/μL)	938.7 (703.8 - 1145.7)	814.9 (665.2 - 1071.7)	0.1364
Número relativo (%)	49.7 (46 - 55.6)	46.7 (41.6 - 52.3)	0.0109
Linfócito T citotóxico (CD3+/CD8+)			
Número absoluto (Cells/μL)	413.2 (332.2 - 558.4)	437.1 (317.4 - 583.1)	0.7952
Número relativo (%)	23.0 (19.0 - 27.2)	23.6 (18.6 - 29.8)	0.5261
Relação CD4+/CD8+	2.1 (1.6 - 2.7)	1.9 (1.4 - 2.6)	0.1334
Linfócito B (CD19+)*			
Número absoluto (Cells/μL)	210 (173.8 - 275.1)	216.7 (158.0 - 302.8)	0.7310
	11.7 (9.5 - 14.1)	12.2 (9.3 - 15.3)	0.4975
Célula Natural Killer (NK)*			
Número absoluto (Cells/μL)	171 (130.1 - 219.4)	208.1 (155.3 - 274.2)	0.0073
Número relativo (%)	9.9 (7.4 - 12.3)	11.1 (8.4 - 15.6)	0.0115

CD, cluster of differentiation

*A soma das observações pode diferir em algumas variáveis devido a dados faltantes

P25 Percentil 25

P75 Percentil 75

† Teste de Mann-Whitney

Tabela 6. Contagem de linfócitos totais e subpopulações de linfócitos em participantes com ansiedade

Parâmetro	Mediana (P25 - P75)		Valor P†
	Com ansiedade (N=54)	Sem ansiedade (N=290)	
Linfócitos totais (x10³/μL)	1.8 (1.5 - 2.1)	1.7 (1.4 - 2.1)	0.5148
Linfócito T (CD3+)			
Número absoluto (Cells/μL)	1402 (1107.7 - 1657.8)	1318.2 (1054.2 - 1631.5)	0.4061
Número relativo (%)	74.6 (70.2 - 78.2)	73.4 (69.2 - 77.7)	0.3563
Linfócito T auxiliar (CD3+/CD4+)			
Número absoluto (Cells/μL)	925.9 (739.8 - 1118.1)	822.8 (665.8 - 1090.2)	0.2511
Número relativo (%)	49.4 (45.3 - 52.7)	46.8 (46.8 - 52.6)	0.1462
Linfócito T citóxico (CD3+/CD8+)			
Número absoluto (Cells/μL)	413.2 (309.7 - 585.5)	437.1 (317.4 - 583.1)	0.6441
Número relativo (%)	22.6 (19.0 - 27.0)	23.6 (18.8 - 29.6)	0.3041
Relação CD4+/CD8+	2.1 (1.7 - 2.7)	1.9 (1.4 - 2.6)	0.1446
Linfócito B (CD19+)*			
Número absoluto (Cells/μL)	212.8 (165.5 - 305.9)	216.7 (162 - 300.1)	0.9679
Número relativo (%)	11.6 (9.3 - 14.7)	12.2 (9.4 - 15.2)	0.8031
Célula Natural Killer (NK)*			
Número absoluto (Cells/μL)	192.5 (149.9 - 263.7)	204.3 (152.9 - 267.4)	0.6091
Número relativo (%)	10.4 (8.5 - 13.9)	11.0 (8.2 - 15.3)	0.4073

CD, cluster of differentiation

*A soma das observações pode diferir em algumas variáveis devido a dados faltantes

P25 Percentil 25

P75 Percentil 75

† Teste de Mann-Whitney

7. DISCUSSÃO

Esta seção se destina apenas à discussão dos resultados da análise das subpopulações de linfócitos nos indivíduos identificados com depressão e ansiedade no presente estudo.

Nos indivíduos com depressão, observamos um aumento na contagem relativa de linfócitos T e linfócitos T auxiliares, além de uma redução na contagem absoluta e relativa de células NK. Na literatura, foi relatada redução nas células NK, sem diferença significativa nos linfócitos T auxiliar, T citotóxico e B (PATAS *et al.*, 2018; SUZUKI *et al.*, 2017). Outro estudo relatou aumento de linfócitos T citotóxicos e redução de células NK (GROSSE *et al.*, 2016). Além da redução na contagem de células NK redução da sua citotoxicidade foi descrita na depressão (CALDWELL; IRWIN; LOHR, 1991; IRWIN *et al.*, 1990; IRWIN; LACHER; CALDWELL, 1992).

Duas metanálises recentes também demonstraram aumento nos valores absolutos de linfócitos T auxiliares, linfócitos B, e também de células NK (FOLEY *et al.*, 2023; SØRENSEN *et al.*, 2023). Isso reforça a ocorrência de alterações das subpopulações na depressão, embora essa questão ainda seja objeto de debate.

As citocinas pró-inflamatórias e as células do sistema imune, incluindo as subpopulações de linfócitos podem ser um elo mecanicista entre o sistema imune e os transtornos mentais. As citocinas inflamatórias conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e podem contribuir para a neuropatologia, afetando o metabolismo dos neurotransmissores, a função neuroendócrina e a plasticidade neural, induzindo a disfunção cognitiva e desregulação emocional diminuindo a síntese e a liberação de serotonina, norepinefrina e dopamina (ZENG *et al.*, 2024). Breeze e colaboradores, utilizando questionário de estado imunológico (ISQ), avaliaram o efeito da ansiedade, do estresse e da depressão no funcionamento imunológico, os resultados apontaram que a ansiedade teve uma maior influência na desregulamentação imunológica (BREEZE *et al.*, 2024). Diferentes estudos demonstraram que os pacientes com ansiedade apresentam uma proporção acentuadamente elevada de linfócitos totais, linfócitos T auxiliares e uma redução de linfócitos T citotóxicos, aumento de células NK, linfócitos B e APCs (ATANACKOVIC *et al.*, 2004; CANLI, 2024; RAPAPORT, 1998).

Estudos também demonstraram aumento nas citocinas inflamatórias IL- β , IL-6 e TNF- α e de PCR (DUIVIS *et al.*, 2013; OGŁODEK *et al.*, 2015; RENNA *et al.*, 2018). Estudos também têm investigado as subpopulações de linfócitos e marcadores inflamatórios na ansiedade em indivíduos com alguma comorbidade, como por exemplo na COVID-19 (MAZZA *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2021), tuberculose (LIU *et al.*, 2022), infarto do miocárdio (WANG *et al.*, 2024), câncer (WANG *et al.*, 2020) e síndrome metabólica (CEN *et al.*, 2024).

Assim como na depressão, diferenças significativas foram relatadas nos estudos, porém a direcionalidade e a causalidade dessas associações ainda precisam ser esclarecidas. Se o aumento das citocinas e subpopulações de linfócitos desencadeia a ansiedade ou se a ansiedade inicia as alterações no sistema imune ou se essa relação pode ser bidirecional, é difícil de responder, e essa questão ainda permanece aberta a discussão (BREEZE *et al.*, 2024). Embora as evidências apontem que a ansiedade pode estar associada à inflamação não encontramos diferença significativa nas subpopulações de linfócitos e ansiedade, o que pode ser parcialmente explicado pelo pequeno número de indivíduos (n=54) identificados com ansiedade em nosso estudo.

O presente estudo apresenta limitações, dentre elas à idade da população, visto que indivíduos jovens não foram incluídos entre os participantes. Além disso, nossa população é composta por indivíduos predominantemente com escolaridade de pós-graduação, tendo em vista que a população é composta por servidores públicos de instituições federais. Na avaliação da depressão e ansiedade houve um pequeno número de indivíduos identificados com depressão e ansiedade, o que limitou as análises estatísticas em nosso estudo. Por fim, deve-se ter cautela ao generalizar os achados para toda a população brasileira, visto que o ELSA-Brasil consiste em uma coorte de servidores públicos de áreas urbanas e a amostra analítica é limitada a um único estado brasileiro.

8. CONCLUSÃO

Os principais objetivos deste estudo foram determinar o IR para subpopulações de linfócitos em participantes do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA) do Estado de Minas Gerais (ELSA-MG) e avaliar a associação da distribuição dessas subpopulações de linfócitos com idade, sexo, hábitos de vida, diabetes, hipertensão, depressão e ansiedade.

Os resultados obtidos no nosso primeiro artigo ressaltaram a importância de se estabelecer IR apropriados a cada população, bem como a necessidade de se considerar intervalos de referência distintos para homens e mulheres, principalmente no que diz respeito a linfócitos T auxiliares, linfócitos B e células NK.

Os resultados do segundo artigo ressaltaram o impacto da idade e do sexo sobre o sistema imune, evidenciado pela redução na contagem das subpopulações de linfócitos com o envelhecimento e pelo seu aumento nas mulheres. Além disso, os hábitos de vida podem exercer influência sobre o sistema imune, o que foi observado pelo aumento da contagem das subpopulações de linfócitos nos indivíduos obesos e tabagistas. Esses resultados ajudam a entender o impacto dos hábitos de vida nas subpopulações de linfócitos e, consequentemente, no sistema imune, na nossa população.

Em relação a saúde mental, alterações foram observadas nos indivíduos identificados com depressão em seu sistema imune, evidenciado pelo aumento de linfócitos T auxiliar e linfócitos T citotóxicos, bem como a redução de células NK. Não encontramos diferença nas subpopulações de linfócitos em relação a ansiedade, o que pode ser explicado pelo número pequeno de indivíduos com esse diagnóstico na nossa população, sendo importante a realização de outras pesquisas para a melhor compreensão dessa relação.

Esperamos que esse trabalho possa contribuir com a utilização de IR próprio da população brasileira considerando as características diversas, encontradas no nosso país. Por fim, esperamos contribuir ainda para a ampliação dos estudos e debates em torno do reflexo dos hábitos de vida e dos transtornos mentais sobre o sistema imune.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, Roshini S.; AUBERT, Geraldine. Flow Cytometry, a Versatile Tool for Diagnosis and Monitoring of Primary Immunodeficiencies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 4, p. 254–271, abr. 2016.

ABSHIRE, Kelly M. *et al.* Alcohol consumption and childhood trauma impact serum immunoglobulin levels in patients with alcohol use disorder. **Alcohol, Clinical and Experimental Research**, v. 49, n. 3, p. 599–608, 22 mar. 2025.

ADA, American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2014. **Diabetes Care**, v. 37, n. Supplement_1, p. S14–S80, 1 jan. 2014.

ALEXANDER, Matthew R. *et al.* Immune Profiling Reveals Decreases in Circulating Regulatory and Exhausted T Cells in Human Hypertension. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 8, n. 3, p. 319–336, mar. 2023.

ALHARBI, Azzah S. *et al.* Interplay Between Sociodemographic Variables, Physical Activity, Sleep, Dietary Habits, and Immune Health Status: A Cross-Sectional Study From Saudi Arabia's Western Province. **Cureus**, 1 jan. 2023.

AL-MAWALI, Adhra *et al.* Lymphocyte subsets: Reference ranges in an age- and gender-balanced population of Omani healthy adults. **Cytometry Part A**, v. 83A, n. 8, p. 739–744, 2 ago. 2013.

AL-THANI, Asma *et al.* Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy Qatari adults. **Biomarkers in Medicine**, v. 9, n. 5, p. 443–452, maio 2015.

ANDERSEN, Catherine J; MURPHY, Kelsey E; FERNANDEZ, Maria Luz. Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity. **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 66–75, jan. 2016.

ANDERSSON, Anders *et al.* Interleukin-16-producing NK cells and T-cells in the blood of tobacco smokers with and without COPD. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. Volume 11, p. 2245–2258, set. 2016.

AQUINO, Estela M.L. *et al.* Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil): objectives and design. **American journal of epidemiology**, v. 175, n. 4, p. 315–324, 15 fev. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22234482/>>. Acesso em: 21 jun. 2023.

ATANACKOVIC, D. *et al.* Immune parameters in patients with anxiety or depression during psychotherapy. **Journal of Affective Disorders**, v. 81, n. 3, p. 201–209, set. 2004.

AYTEKIN, Mujdat; EMERK, Kaya. Accurate Reference Intervals are Required for Accurate Diagnosis and Monitoring of Patients. **EJIFCC**, v. 19, n. 2, p. 137–41, out. 2008.

AZIZOV, Vugar; ZAISS, Mario M. Alcohol Consumption in Rheumatoid Arthritis: A Path through the Immune System. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1324, 16 abr. 2021.

BAILIN, Samuel S *et al.* T Lymphocyte Subsets Associated With Prevalent Diabetes in Veterans With and Without Human Immunodeficiency Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 2, p. 252–262, 29 jun. 2020.

BAINBRIDGE, John *et al.* Laboratory Accuracy Improvement in the UK NEQAS Leucocyte Immunophenotyping Immune Monitoring Program: An Eleven-Year Review via Longitudinal Mixed Effects Modeling. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 94, n. 2, p. 250–256, 1 mar. 2018. Acesso em: 21 jun. 2023.

BALDERAS-VAZQUEZ, Cecilia Luz *et al.* Association Between Socio-Affective Symptoms and Glutathione and CD4 and CD8 Lymphocytes in College Students. **Frontiers in Psychology**, v. 12, 5 jan. 2022.

BEUREL, Eléonore; TOUPS, Marisa; NEMEROFF, Charles B. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. **Neuron**, v. 107, n. 2, p. 234–256, jul. 2020.

BIZUTI, Matheus Ribeiro *et al.* Influence of exercise and vitamin D on the immune system against Covid-19: an integrative review of current literature. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 477, n. 6, p. 1725–1737, 8 jun. 2022.

BREEZE, Catherine *et al.* Unique contributions of anxiety, stress and depression to immunity: A cross-cultural investigation. **Journal of Affective Disorders Reports**, v. 15, p. 100699, jan. 2024.

BRESTOFF, Jonathan R. Full spectrum flow cytometry in the clinical laboratory. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 45, n. S2, p. 44–49, 21 jun. 2023.

CALDWELL, Cindy L.; IRWIN, Michael; LOHR, James. Reduced natural killer cell cytotoxicity in depression but not in schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 30, n. 11, p. 1131–1138, dez. 1991.

CANLI, Derya. Evaluation of systemic immune-inflammation index, systemic inflammatory response index and hematologic inflammatory parameters in generalized anxiety disorder: a controlled study. **Anatolian Current Medical Journal**, v. 6, n. 2, p. 161–167, 8 mar. 2024.

CARTY, Shannon A. Immunology 101: fundamental immunology for the practicing hematologist. **Hematology**, v. 2021, n. 1, p. 281–286, 10 dez. 2021.

CASTAÑEDA-SÁNCHEZ, Jorge Ismael *et al.* B Lymphocyte as a Target of Bacterial Infections. **Lymphocyte Updates - Cancer, Autoimmunity and Infection**, 12 jul. 2017. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/56179>>. Acesso em: 3 jul. 2025.

CEN, Manqiu *et al.* Associations between metabolic syndrome and anxiety, and the mediating role of inflammation: Findings from the UK Biobank. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 116, p. 1–9, fev. 2024.

CHANG, Syuan-Ting *et al.* Age-dependent immune profile in healthy individuals: an original study, systematic review and meta-analysis. **Immunity & Ageing**, v. 21, n. 1, p. 75, 29 out. 2024.

CHAPLIN, David D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S3–S23, fev. 2010.

CHEN, Oliver *et al.* The Role of Oat Nutrients in the Immune System: A Narrative Review. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1048, 24 mar. 2021.

CHILDS; CALDER; MILES. Diet and Immune Function. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1933, 16 ago. 2019.

CLSI. **Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory**. Third Edition ed., 2008.

COSKUN, Abdurrahman *et al.* Personalized reference intervals: from theory to practice. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 59, n. 7, p. 501–516, 3 out. 2022.

COSTA, Rodrigo Netto. **Introdução a Citometria de Fluxo: um manual para iniciantes**. 2. ed. Curitiba, 2022. Disponível em: <<https://www.icc.fiocruz.br/extensaodivulgacaocientifica/wp-content/uploads/2022/10/Livro-Citometria-21-10-1.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2024.

CRUVINEL, Wilson de Melo *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–447, ago. 2010.

CUI, Shu *et al.* Correlation of systemic immune-inflammation index and moderate/major depression in patients with depressive disorders: a large sample cross-sectional study. **Frontiers in Psychiatry**, v. 14, 18 maio 2023.

DA SILVEIRA, Matheus Pelinski *et al.* Physical exercise as a tool to help the immune system against COVID-19: an integrative review of the current literature. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 21, n. 1, p. 15–28, 29 fev. 2021.

DAËRON, Marc. The immune system as a system of relations. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 13 set. 2022.

DAI, Bindong; XIAO, Chunfeng; WEI, Jing. The Role of the Immune System in the Onset and Regulation of Anxiety Disorders. **Integrated Science**, p. 231–246, 2024. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-031-72079-6_9#citeas>. Acesso em: 3 jul. 2025.

DAMIOT, Anthony *et al.* Immunological Implications of Physical Inactivity among Older Adults during the COVID-19 Pandemic. **Gerontology**, v. 66, n. 5, p. 431–438, 2020.

DAOUD, A. K. *et al.* Effects of diabetes mellitus vs. *in vitro* hyperglycemia on select immune cell functions. **Journal of Immunotoxicology**, v. 6, n. 1, p. 36–41, mar. 2009.

DE CIUCEIS, Carolina *et al.* Immune Mechanisms in Hypertension. **High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention**, v. 21, n. 4, p. 227–234, 21 dez. 2014.

DE FIGUEIREDO, Adélia Marques *et al.* Diagnostic applications of microsphere-based flow cytometry: A review. **Experimental Biology and Medicine**, v. 247, n. 20, p. 1852–1861, 16 out. 2022.

DOYLE, Kelly; BUNCH, Dustin R. Reference intervals: past, present, and future. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 60, n. 6, p. 466–482, 18 ago. 2023.

DUIVIS, Hester E. *et al.* Differential association of somatic and cognitive symptoms of depression and anxiety with inflammation: Findings from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 9, p. 1573–1585, set. 2013.

EL ALLAM, Aicha *et al.* Age-stratified pediatric reference values of lymphocytes in the Moroccan population. **Human Antibodies**, v. 29, n. 1, p. 85–94, 24 mar. 2021.

ELLULU, Mohammed S. *et al.* Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. **Archives of Medical Science**, v. 4, p. 851–863, 2017.

ENAWGAW, Bamlaku *et al.* Haematological and immunological reference intervals for adult population in the state of Amhara, Ethiopia. **Tropical Medicine and International Health**, v. 23, n. 7, p. 765–773, 1 jul. 2018. Acesso em: 21 jun. 2023.

FARHOOD, Bagher; NAJAFI, Masoud; MORTEZAEE, Keywan. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 6, p. 8509–8521, 22 jun. 2019.

FARIA, Ana Maria Caetano *et al.* Variation Rhythms of Lymphocyte Subsets during Healthy Aging. **NeuroImmunoModulation**, v. 15, n. 4-6, p. 365–379, 1 jan. 2008.

FARRELL, Christopher-John L; NGUYEN, Lan. Indirect Reference Intervals: Harnessing the Power of Stored Laboratory Data. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 40, n. 2, p. 99–111, maio 2019.

FLORES-GONZALEZ, Julio; CANCINO-DÍAZ, Juan Carlos; CHAVEZ-GALAN, Leslie. Flow Cytometry: From Experimental Design to Its Application in the Diagnosis and Monitoring of Respiratory Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8830, 22 nov. 2020.

FOLEY, Éimear M. *et al.* Peripheral blood cellular immunophenotype in depression: a systematic review and meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 1004–1019, 28 mar. 2023.

FORD, Nathan *et al.* The evolving role of CD4 cell counts in HIV care. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 12, n. 2, p. 123–128, mar. 2017.

FORSYTH, Katherine S. *et al.* The connexion between sex and immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 24, n. 7, p. 487–502, 21 jul. 2024.

FRITZ GARCÍA, José Héctor Gibrán; KELLER VALSECCHI, Claudia Isabelle; BASILICATA, M. Felicia. Sex as a biological variable in ageing: insights and perspectives on the molecular and cellular hallmarks. **Open Biology**, v. 14, n. 10, 30 out. 2024.

GARCÍA-DABRIO, María Concepción *et al.* Influence of Age, Gender and Lifestyle in Lymphocyte Subsets: Report from the Spanish Gait-2 Study. **Acta Haematologica**, v. 127, n. 4, p. 244–249, 2012.

GARCIA-PRAT, Marina *et al.* Extended immunophenotyping reference values in a healthy pediatric population. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 96, n. 3, p. 223–233, 17 maio 2019.

GASPERSZ, Roxanne *et al.* The role of anxious distress in immune dysregulation in patients with major depressive disorder. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 12, p. 1268, 8 dez. 2017.

GIALLUISI, A. *et al.* Lifestyle and biological factors influence the relationship between mental health and low-grade inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 85, p. 4–13, mar. 2020.

GROSSE, Laura *et al.* Circulating cytotoxic T cells and natural killer cells as potential predictors for antidepressant response in melancholic depression. Restoration of T regulatory cell populations after antidepressant therapy. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 9, p. 1679–1688, 8 maio 2016.

GU, Yan *et al.* Low absolute CD4⁺ T cell counts in peripheral blood predict poor prognosis in patients with newly diagnosed multiple myeloma. **Leukemia & Lymphoma**, v. 61, n. 8, p. 1869–1876, 2 jul. 2020.

GUILLEREY, Camille. NK Cells in the Tumor Microenvironment. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1273, p. 69–90, 2020.

GUSTAFSON, Michael P *et al.* Exercise and the immune system: taking steps to improve responses to cancer immunotherapy. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 9, n. 7, p. e001872, 2 jul. 2021.

GUZIK, Tomasz J. *et al.* Immune and inflammatory mechanisms in hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, v. 21, n. 6, p. 396–416, 3 jun. 2024.

HARRIS, E K; BOYD, J C. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. **Clinical chemistry**, v. 36, n. 2, p. 265–70, fev. 1990.

HASNIS, E *et al.* Cigarette smoke-induced NF-kappaB activation in human lymphocytes: the effect of low and high exposure to gas phase of cigarette smoke. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 58 Suppl 5, n. Pt 1, p. 263–74, nov. 2007a.

HASNIS, E *et al.* Mechanisms underlying cigarette smoke-induced NF-kappaB activation in human lymphocytes: the role of reactive nitrogen species. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 58 Suppl 5, n. Pt 1, p. 275–87, nov. 2007b.

HOFFMANN, Mauricio Scopel *et al.* Common and specific aspects of anxiety and depression and the metabolic syndrome. **Journal of Psychiatric Research**, v. 137, p. 117–125, maio 2021.

HOROWITZ, Gary L. Reference Intervals: Practical Aspects. **EJIFCC**, v. 19, n. 2, p. 95–105, out. 2008.

HUANG, Wei *et al.* Lymphocyte Subset Counts in COVID-19 Patients: A Meta-Analysis. **Cytometry Part A**, v. 97, n. 8, p. 772–776, 16 jun. 2020.

IRWIN, Michael *et al.* Reduction of immune function in life stress and depression. **Biological Psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 22–30, jan. 1990.

IRWIN, Michael; LACHER, Ute; CALDWELL, Cindy. Depression and reduced natural killer cytotoxicity: a longitudinal study of depressed patients and control subjects. **Psychological Medicine**, v. 22, n. 4, p. 1045–1050, 9 nov. 1992.

JIANG, Junliang *et al.* Intertwined associations between oxytocin, immune system and major depressive disorder. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 163, p. 114852, jul. 2023.

JIANG, Nan *et al.* Peripheral Inflammatory Cytokines and Lymphocyte Subset Features of Deceased COVID-19 Patients. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1–12, 22 jan. 2021.

KANEGANE, Hirokazu *et al.* Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. **Allergology International**, v. 67, n. 1, p. 43–54, jan. 2018.

KIANI, Pantea *et al.* Pandemic Preparedness: Maintaining Adequate Immune Fitness by Attaining a Normal, Healthy Body Weight. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 14, p. 3933, 6 jul. 2022.

KNIGHT, Vijaya. The utility of flow cytometry for the diagnosis of primary immunodeficiencies. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 41, n. S1, p. 63–72, 8 maio 2019.

KOKUINA, Elena *et al.* Normal Values of T, B and NK Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of Healthy Cuban Adults. **MEDICC Review**, v. 21, n. 2–3, 2019. Disponível em: <<https://mediccreview.org/normal-values/>>. Acesso em: 21 jun. 2023.

KRONFOL, Ziad *et al.* Impaired lymphocyte function in depressive illness. **Life Sciences**, v. 33, n. 3, p. 241–247, jul. 1983.

KUMAR, Brahma V.; CONNORS, Thomas J.; FARBER, Donna L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. **Immunity**, v. 48, n. 2, p. 202–213, fev. 2018.

KÜNZLI, Marco; MASOPUST, David. CD4⁺ T cell memory. **Nature Immunology**, v. 24, n. 6, p. 903–914, 8 jun. 2023.

LAI, Jiann-Jyh *et al.* Androgen Receptor Influences on Body Defense System via Modulation of Innate and Adaptive Immune Systems. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 5, p. 1504–1512, nov. 2012.

LAMERS, Femke *et al.* Longitudinal Association Between Depression and Inflammatory Markers: Results From the Netherlands Study of Depression and Anxiety. **Biological Psychiatry**, v. 85, n. 10, p. 829–837, maio 2019.

LAUZIN, Debora Danielle Balduino. **Avaliação da acurácia e confiabilidade de dois analisadores hematológicos automatizados**. 2017. 1–67 f. Dissertação – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

LEE, Hoyul *et al.* Impact of hyperglycemia on immune cell function: a comprehensive review. **Diabetology International**, v. 15, n. 4, p. 745–760, 12 out. 2024.

LI, Na; HUA, Jinlian. Immune cells in liver regeneration. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 3628–3639, 10 jan. 2017.

LIGOTTI, Mattia Emanuela *et al.* Analysis of T and NK cell subsets in the Sicilian population from young to supercentenarian: The role of age and gender. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 205, n. 2, p. 198–212, 12 jul. 2021.

LIU, Wei; BRETZ, Frank; CORTINA-BORJA, Mario. Reference range: Which statistical intervals to use? **Statistical Methods in Medical Research**, v. 30, n. 2, p. 523–534, 14 fev. 2021.

LIU, Xiangmin *et al.* Association between depression or anxiety symptoms and immune-inflammatory characteristics in in-patients with tuberculosis: A cross-sectional study. **Frontiers in Psychiatry**, v. 13, 20 out. 2022.

LIU, Zaoqu *et al.* Immunosenescence: molecular mechanisms and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 200, 13 maio 2023.

LOUATI, Nour *et al.* Blood lymphocyte T subsets reference values in blood donors by flow cytometry. **La Tunisie medicale**, v. 97, n. 2, p. 327–334, fev. 2019.

LYNALL, Mary-Ellen *et al.* Peripheral Blood Cell–Stratified Subgroups of Inflamed Depression. **Biological Psychiatry**, v. 88, n. 2, p. 185–196, jul. 2020.

MA, Cindy S; TANGYE, Stuart G. Flow Cytometric-Based Analysis of Defects in Lymphocyte Differentiation and Function Due to Inborn Errors of Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 4 set. 2019.

MA, Zhen *et al.* Causal role of immune cells in generalized anxiety disorder: Mendelian randomization study. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 9 jan. 2024.

MANSOURABADI, Amir Hossein *et al.* B lymphocytes in COVID-19: a tale of harmony and discordance. **Archives of Virology**, v. 168, n. 5, p. 148, 29 maio 2023.

MARSHALL, Jean S. *et al.* An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 14, n. S2, p. 49, 12 set. 2018.

MATSUDO, Sandra *et al.* QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA (IPAQ): ESTUDO DE VALIDADE E REPRODUTIBILIDADE NO BRASIL. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v. 6, n. 2, p. 5–18, 15 out. 2012.

MAZZA, Mario Gennaro *et al.* Anxiety and depression in COVID-19 survivors: Role of inflammatory and clinical predictors. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 89, p. 594–600, out. 2020.

MCCOMB, Scott *et al.* Introduction to the Immune System. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2024, p. 1–24, 2019.

MCKINNON, Katherine M. Flow Cytometry: An Overview. **Current Protocols in Immunology**, v. 120, n. 1, 21 jan. 2018.

MCMASTER, William G. *et al.* Inflammation, Immunity, and Hypertensive End-Organ Damage. **Circulation Research**, v. 116, n. 6, p. 1022–1033, 13 mar. 2015.

MESQUITA JÚNIOR, Danilo *et al.* Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552–580, out. 2010.

MIKOLAJCZYK, Tomasz P.; GUZIK, Tomasz J. Adaptive Immunity in Hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 21, n. 9, p. 68, 18 set. 2019.

MILANESCHI, Yuri *et al.* Association of inflammation with depression and anxiety: evidence for symptom-specificity and potential causality from UK Biobank and NESDA cohorts. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 12, p. 7393–7402, 16 dez. 2021.

MILLER, Andrew H.; RAISON, Charles L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p. 22–34, 29 jan. 2016.

MIN, Xue *et al.* Association between inflammatory cytokines and symptoms of major depressive disorder in adults. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 13 fev. 2023.

MOLINA, Maria del Carmen Bisi *et al.* Reprodutibilidade e validade relativa do Questionário de Frequência Alimentar do ELSA-Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 379–389, fev. 2013.

MOLINA, Patricia E *et al.* Focus on: Alcohol and the immune system. **Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 33, n. 1–2, p. 97–108, 2010.

MORAIS, Isa Rita Brito De *et al.* Determining reference ranges for immunological cells of healthy indigenous individuals from a region in Brazil. **einstein (São Paulo)**, v. 21, 11 out. 2023.

MORAES-PINTO, Maria Isabel de. *et al.* Valores de referência de linfócitos/mm³ em população brasileira saudável, Braz. **Group Prim., Immunodef. Disord**, v. 3, p. 1-4, 2006.

ISABEL, Maria *et al.* Lymphocyte subsets in human immunodeficiency virus-unexposed Brazilian individuals from birth to adulthood. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 8, p. 989–998, 20 nov. 2014.

MORVAN, Maelig G.; LANIER, Lewis L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 7–19, 23 jan. 2016.

MOSZCZYŃSKI, P. *et al.* Immunological findings in cigarette smokers. **Toxicology Letters**, v. 118, n. 3, p. 121–127, jan. 2001.

MUKHARJEE, Suchismita; BANK, Sarbashri; MAITI, Smarajit. Chronic Tobacco Exposure by Smoking Develops Insulin Resistance. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 20, n. 6, p. 869–877, 17 jul. 2020.

MÜLLER, Jens *et al.* Reference Intervals in Coagulation Analysis. **Hämostaseologie**, v. 42, n. 06, p. 381–389, 22 dez. 2022.

MÜLLER, Ludmila; DI BENEDETTO, Svetlana; PAWELEC, Graham. The Immune System and Its Dysregulation with Aging. **Sub-cellular biochemistry**, v. 91, p. 21–43, 2019.

NAJJAR, Souhel *et al.* Neuroinflammation and psychiatric illness. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 816, 1 dez. 2013.

NOWAK, Jan *et al.* Immune cell-specific smoking-related expression characteristics are revealed by re-analysis of transcriptomes from the CEDAR cohort. **Central European Journal of Immunology**, v. 47, n. 3, p. 246–259, 2022.

NUNES, Kelly *et al.* Admixture's impact on Brazilian population evolution and health. **Science**, v. 388, n. 6748, 15 maio 2025. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.adl3564>>. Acesso em: 15 set. 2025.

NUNES, Maria Angélica *et al.* Adaptação transcultural do CIS-R (Clinical Interview Schedule - Revised Version) para o português no estudo longitudinal de saúde do adulto (ELSA). **Clinical and Biomedical Research**, v. 31, n. 4, p. 487–490, 2012. Disponível em: <<https://seer.ufrgs.br/index.php/hcpa/article/view/24065>>. Acesso em: 2 dez. 2023.

OBERMANN, Jasmin *et al.* Analysis of cytokine levels, T regulatory cells and serotonin content in patients with depression. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 10, p. 3476–3489, 4 maio 2021.

OGŁODEK, Ewa A. *et al.* The MCP-1, CCL-5 and SDF-1 chemokines as pro-inflammatory markers in generalized anxiety disorder and personality disorders. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 1, p. 85–89, fev. 2015.

OLSON, Nels C. *et al.* Associations of Circulating Lymphocyte Subpopulations with Type 2 Diabetes: Cross-Sectional Results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139962, 12 out. 2015.

PASALA, Sumana; BARR, Tasha; MESSAOUDI, Ilhem. Impact of Alcohol Abuse on the Adaptive Immune System. **Alcohol research: current reviews**, v. 37, n. 2, p. 185–97, 2015.

PATAS, Kostas *et al.* T Cell Phenotype and T Cell Receptor Repertoire in Patients with Major Depressive Disorder. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 20 fev. 2018.

PITANGA, Francisco José Gondim *et al.* Leisure Time Physical Activity and SARS-CoV-2 Infection among ELSA-Brasil Participants. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 21, p. 14155, 29 out. 2022.

QURESHI, Danial *et al.* Association between metabolic syndrome and risk of incident dementia in UK Biobank. **Alzheimer's & Dementia**, v. 20, n. 1, p. 447–458, 7 jan. 2024.

RAPAPORT, Mark Hyman. Circulating Lymphocyte Phenotypic Surface Markers in Anxiety Disorder Patients and Normal Volunteers. **Biological Psychiatry**, v. 43, n. 6, p. 458–463, mar. 1998.

RATTER-RIECK, Jacqueline M. *et al.* Leukocyte Counts and T-Cell Frequencies Differ Between Novel Subgroups of Diabetes and Are Associated With Metabolic Parameters and Biomarkers of Inflammation. **Diabetes**, v. 70, n. 11, p. 2652–2662, 1 nov. 2021.

RENNA, Megan E. *et al.* The association between anxiety, traumatic stress, and obsessive-compulsive disorders and chronic inflammation: A systematic review and meta-analysis. **Depression and Anxiety**, v. 35, n. 11, p. 1081–1094, nov. 2018.

RICOS, Carmen. **Desirable Biological Variation Database specifications**. Disponível em: <<https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>>. Acesso em: 1 nov. 2023.

RIOS, Danyelle Romana Alves *et al.* Performance and reference intervals of thrombin generation test: results from the Brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil). A cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 140, n. 3, p. 474–485, jun. 2022. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-31802022000300474&tlng=en>. Acesso em: 21 jun. 2023.

RIVERA-CARRANZA, Tania *et al.* The link between lymphocyte subpopulations in peripheral blood and metabolic variables in patients with severe obesity. **PeerJ**, v. 11, p. e15465, 13 jun. 2023.

ROBINSON, J. Paul *et al.* Flow Cytometry: The Next Revolution. **Cells**, v. 12, n. 14, p. 1875, 17 jul. 2023.

ROSENFELD, Luiz Gastão *et al.* Valores de referência para exames laboratoriais de hemograma da população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, n. suppl 2, 2019.

RUDOLF-OLIVEIRA, Renata Cristina Messores *et al.* Determination of lymphocyte subset reference ranges in peripheral blood of healthy adults by a dual-platform flow cytometry method. **Immunology Letters**, v. 163, n. 1, p. 96–101, jan. 2015.

RUSSO, Ricardo Toledo *et al.* **Treinamento em quantificação de linfócitos T CD4+/CD8+ por citometria de fluxo- plataforma BD FACSCalibur 4 cores**. BD ed. São Paulo, 2010.

SÁ, Ana Carolina Micheletti Gomide Nogueira De *et al.* Intervalos de referência de hemograma da população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 26, n. suppl 1, 2023.

SAH, Anupam; SINGEWALD, Nicolas. The (neuro)inflammatory system in anxiety disorders and PTSD: Potential treatment targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 269, p. 108825, maio 2025.

SANTOS, Alessandro Marins Dos *et al.* **Citometria de fluxo: fundamentos e aplicações na pesquisa científica**. Curso de Verão de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 2018. Disponível em: <https://www.ioc.fiocruz.br/picf/PROD_LITERAT/Apostilas/ApostilaCMFCurso_Ferias2018.pdf>. Acesso em: 7 jan. 2024.

SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 89, n. 3, p. 24–79, set. 2007. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abc/a/wHymbYzVmjY77q65x68QcdN>>. Acesso em: 10 jun. 2025.

SCHIFFRIN, Ernesto L. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. **Clinical Science**, v. 126, n. 4, p. 267–274, 1 fev. 2014.

SCHLEH, Michael W. *et al.* Metaflammation in obesity and its therapeutic targeting. **Science Translational Medicine**, v. 15, n. 723, 22 nov. 2023.

SCHMIDT, Maria Inês *et al.* Cohort profile: Longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil). **International Journal of Epidemiology**, v. 44, n. 1, p. 68–75, 1 fev. 2015. Acesso em: 21 jun. 2023.

SCULLY, Crispian; GEORGAKOPOULOU, Eleni A; HASSONA, Yazan. The immune system: basis of so much health and disease: 3. adaptive immunity. **Dental Update**, v. 44, n. 4, p. 322–327, 2 abr. 2017a.

SCULLY, Crispian; GEORGAKOPOULOU, Eleni A; HASSONA, Yazan. The immune system: basis of so much health and disease: 4. immunocytes. **Dental Update**, v. 44, n. 5, p. 436–442, 2 maio 2017b.

SHAHAL-ZIMRA, Yael *et al.* Lymphocyte Subset Reference Ranges in Healthy Israeli Adults. **The Israel Medical Association journal: IMAJ**, v. 18, n. 12, p. 739–743, dez. 2016.

SHALCHI-AMIRKHIZ, Puya *et al.* Pilot study on the influence of acute alcohol exposure on biophysical parameters of leukocytes. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10, 8 ago. 2023.

SHARMA, Archana *et al.* Differential alterations of tissue T-cell subsets after sepsis. **Immunology Letters**, v. 168, n. 1, p. 41–50, nov. 2015.

SIEDLINSKI, Mateusz *et al.* White Blood Cells and Blood Pressure. **Circulation**, v. 141, n. 16, p. 1307–1317, 21 abr. 2020.

SILVA, Daniela Alves *et al.* Depression is associated with increased adiposity in a 4-year follow-up: results from the ELSA-Brasil. **Journal of Affective Disorders**, v. 282, p. 179–186, mar. 2021.

SØRENSEN, Nina Vindegaard *et al.* Immune cell composition in unipolar depression: a comprehensive systematic review and meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 28, n. 1, p. 391–401, 14 jan. 2023.

STRZELAK, Agnieszka *et al.* Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 5, p. 1033, 21 maio 2018.

STRZELEC, Martyna *et al.* Immunomodulation—a general review of the current state-of-the-art and new therapeutic strategies for targeting the immune system. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 9 mar. 2023.

SUZUKI, Hideo *et al.* Altered populations of natural killer cells, cytotoxic T lymphocytes, and regulatory T cells in major depressive disorder: Association with sleep disturbance. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 66, p. 193–200, nov. 2017.

SWABY, Anikka *et al.* Lifestyle and host determinants of antitumor immunity and cancer health disparities. **Trends in Cancer**, v. 9, n. 12, p. 1019–1040, dez. 2023.

SYED, Shariful A. *et al.* Defective Inflammatory Pathways in Never-Treated Depressed Patients Are Associated with Poor Treatment Response. **Neuron**, v. 99, n. 5, p. 914–924.e3, set. 2018.

SYSMEX. **Analísadores Hematológicos Automatizados Série XN**. 2012. Disponível em: <<https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Tecnologia-Portugu%C3%AAs.pdf>>. Acesso em: 8 jan. 2024.

SYSMEX. **Analísadores Hematológicos Automatizados Sysmex Série-XN™ Novo Design. Novas Possibilidades**. 2014. Disponível em: <<http://medica-ne.com.br/archives/folder-sysmex.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2024.

SYSMEX. **Automated Haematology Analysers XN-3000** 2019. Disponível em: <<https://www.sysmex-ap.com/wp-content/uploads/2020/05/XN-3000-Ebook-March-2019.pdf>>. Acesso em: 8 jan. 2024.

SZABO, Gyongyi *et al.* Acute Alcohol Consumption Inhibits Accessory Cell Function of Monocytes and Dendritic Cells. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 28, n. 5, p. 824–828, 13 maio 2004.

SZABO, Gyongyi; MANDREKAR, Pranoti. A Recent Perspective on Alcohol, Immunity, and Host Defense. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 33, n. 2, p. 220–232, 22 fev. 2009.

SZABO, Gyongyi; SAHA, Banishree. Alcohol's Effect on Host Defense. **Alcohol research: current reviews**, v. 37, n. 2, p. 159–70, 2015.

TAKASHIMA, Takehiro *et al.* Multicolor Flow Cytometry for the Diagnosis of Primary Immunodeficiency Diseases. **Journal of Clinical Immunology**, v. 37, n. 5, p. 486–495, 8 jul. 2017.

TORRES, A.J.L. *et al.* Reference range for T lymphocytes populations in blood donors from two different regions in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 3, p. 221–225, jun. 2009.

TORRES, Gabrielle Guidoni *et al.* Consumo de bebidas alcoólicas e obesidade abdominal: resultados da linha de base do ELSA-Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 27, n. 2, p. 737–746, fev. 2022.

TOSATO, Francesca *et al.* Biological variability of lymphocyte subsets of human adults' blood. **Clinica Chimica Acta**, v. 424, p. 159–163, set. 2013.

VAN EEDEN, Wessel A. *et al.* Basal and LPS-stimulated inflammatory markers and the course of anxiety symptoms. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 98, p. 378–387, nov. 2021.

VILLEGAS-VALVERDE, Carlos A; KOKUINA, Elena; BREFF-FONSECA, Martha C. Determination of Reference Values for Double-Negative T Lymphocytes in Cuban Adults. **MEDICC Review**, v. 22, n. 4, p. 48, out. 2020.

VILLEGAS-VALVERDE, Carlos A; KOKUINA, Elena; BREFF-FONSECA, Martha C. Estimating Normal Values of Rare T-lymphocyte Populations in Peripheral Blood of Healthy Cuban Adults. **MEDICC Review**, v. 20, n. 4, p. 20, out. 2018.

WADA, Fumiya *et al.* T-cell counts in peripheral blood at leukapheresis predict responses to subsequent CAR-T cell therapy. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 18696, 4 nov. 2022.

WANG, Fan *et al.* Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 11, p. 1762–1769, 11 maio 2020.

WANG, Jing *et al.* Exercise Regulates the Immune System. **Advances in experimental medicine and biology**, p. 395–408, 1 jan. 2020.

WANG, Lina *et al.* Correlation between Anxiety, Depression and Changes in Th17/Treg and Inflammatory Levels in Patients with Pulmonary Nodules. **DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)**, v. 23, n. 7, p. 554–560, 20 jul. 2020.

WANG, Shuo *et al.* Annual biological variation and personalized reference intervals of clinical chemistry and hematology analytes. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 60, n. 4, p. 606–617, 28 mar. 2022.

WANG, Xuechao *et al.* Linkage of CDC42 And T-helper Cell Ratio With Anxiety, Depression And Quality of Life in ST-Elevation Myocardial Infarction. **Biomarkers in Medicine**, v. 18, n. 5, p. 157–168, 5 mar. 2024.

WIK, Jonas Aakre; SKÅLHEGG, Bjørn Steen. T Cell Metabolism in Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 14 mar. 2022.

WON, Eunsoo; KIM, Yong-Ku. Neuroinflammation-Associated Alterations of the Brain as Potential Neural Biomarkers in Anxiety Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6546, 7 set. 2020.

WONG, W. S. *et al.* Reference Ranges for Lymphocyte Subsets among Healthy Hong Kong Chinese Adults by Single-Platform Flow Cytometry. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 4, p. 602–606, abr. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Active Ageing A Policy Framework**. abr. 2022. Disponível em: <https://extranet.who.int/agefriendlyworld/wp-content/uploads/2014/06/WHO-Active-Ageing-Framework>>. Acesso em: 4 dez. 2023.

WU, Congchong *et al.* Correlation between anxiety-depression symptoms and immune characteristics in inpatients with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Journal of Psychiatric Research**, v. 141, p. 378–384, set. 2021.

WU, Song-Yang *et al.* Natural killer cells in cancer biology and therapy. **Molecular Cancer**, v. 19, n. 1, p. 120, 6 dez. 2020.

XIA, Ying *et al.* Reference range of naïve T and T memory lymphocyte subsets in peripheral blood of healthy adult. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 207, n. 2, p. 208–217, 4 abr. 2022.

XU, Yudai *et al.* An in-depth understanding of the role and mechanisms of T cells in immune organ aging and age-related diseases. **Science China Life Sciences**, v. 68, n. 2, p. 328–353, 2 fev. 2025.

ZENG, Yu *et al.* Inflammatory Biomarkers and Risk of Psychiatric Disorders. **JAMA Psychiatry**, v. 81, n. 11, p. 1118, 1 nov. 2024.

ZUO, Qianlin *et al.* Associations of metabolic syndrome with cognitive function and dementia risk: Evidence from the <scp>UK</scp> Biobank cohort. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 26, n. 12, p. 6023–6033, 3 dez. 2024.

10. ANEXOS

Anexo 1. CIS-R - Clinical Interview Scheduled Revised

ID NUMERO:							
------------	--	--	--	--	--	--	--



Informações Administrativas:

0a. Data da entrevista: / /

0b. Nº Entrevistador(a):

CIS-R (CIS)

MÓDULO APETITE E PESO	
Entrevistador(a):DIGA AO PARTICIPANTE: "Agora vamos conversar sobre seu apetite e peso"	
Q1. <u>Nos últimos 30 dias</u> , o(a) Sr(a) notou uma diminuição significativa no seu apetite?	
☐ Sim	
☐ Não	
Q2. <u>Nos últimos 30 dias</u> , o(a) Sr(a) perdeu peso?	
☐ Sim ----- →	Q2a. O(a) Sr(a) está tentando perder peso ou está de dieta?
	☐ Sim (PULE PARA A SEÇÃO A)
	☐ Não (SIGA PARA A QUESTÃO Q.2b)
☐ Não / Não sei (SIGA PARA A QUESTÃO Q.3)	
Q2b. O(a) Sr(a) perdeu <u>3,0</u> kg ou mais ou perdeu menos que isso?	
☐ Sim, perdeu 3,0 kg ou mais (PULE PARA A SEÇÃO A)	
☐ Não, perdeu menos que 3,0 kg (PULE PARA A SEÇÃO A)	
☐ NÃO SABE/NÃO QUER RESPONDER	
Q3. <u>Nos últimos 30 dias</u> , o(a) Sr(a) notou um aumento significativo no seu apetite?	
☐ Sim	
☐ Não	
☐ NÃO SABE/NÃO QUER RESPONDER	
Q4. <u>Nos últimos 30 dias</u> o(a) Sr(a) ganhou peso?	

☐ Sim
☐ Não
☐ NÃO SABE/NÃO QUER RESPONDER

ID NUMERO:							
------------	--	--	--	--	--	--	--



Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto

ELSA BRASIL

Agora gostaria de fazer algumas perguntas sobre como o(a) senhor(a) tem se sentido nos últimos dias.

Algumas questões referem-se aos últimos 30 dias, isto é, desde o dia (**DIA DA ENTREVISTA**) do (**MÊS PASSADO**) até ontem, e aos últimos 7 dias, isto é, desde a (**DIA DA SEMANA**) passada até ontem.

SEÇÃO A

A1. Nos últimos 30 dias, o(a) Sr(a) teve algum tipo de dor?

☐ Sim

☐ Não ----->

A2. Durante os últimos 30 dias, o(a) Sr(a) teve algum tipo de desconforto que lhe incomodou, como por exemplo, dor de cabeça ou indigestão?

☐ Sim

☐ Não (**PULE PARA A SEÇÃO B**)

A3. Essa [dor/desconforto] apareceu ou piorou porque o(a) Sr(a) estava se sentindo "para baixo", ansioso(a) ou estressado(a)?

SE PARTICIPANTE TIVER MAIS DE UM(A) [DOR/DESCONFORTO] REFIRA QUALQUER DELAS

☐ Sim

☐ Não (**PULE PARA A SEÇÃO B**)

A4. Nos últimos 7 dias, desde o último (DIA DA SEMANA) até ontem, em quantos dias o(a) Sr(a) sentiu [dor/desconforto]?

☐ 4 dias ou mais

☐ 1 a 3 dias

☐ nenhum (**PULE PARA A SEÇÃO B**)

A5. Nos últimos 7 dias, essa(e) [dor/desconforto] durou mais de 3 horas no total, [em algum dia /naquele dia]?

☐ Sim

☐ Não

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

A6. Nos últimos 7 dias, essa [dor/desconforto] foi: **(LEIA AS ALTERNATIVAS)**

☐ muito desagradável

☐ um pouco desagradável

☐ ou não foi desagradável?

A7. Nos últimos 7 dias, essa [dor/desconforto] lhe incomodou quando o(a) Sr(a) estava fazendo alguma coisa interessante?

☐ Sim

☐ Não/ não fez nada interessante

A8. Há quanto tempo o(a) Sr(a) tem sentido essa [dor/desconforto] do modo como o(a) Sr(a) me descreveu?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.

☐ Menos que duas semanas

☐ Entre duas semanas e menos de seis meses

☐ Entre seis meses e menos de um ano

☐ Entre um ano e menos de dois anos

☐ Dois anos ou mais

Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 01.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO BB1. Nos últimos 30 dias, o(a) Sr(a) se sentiu cansado(a)?☐ Sim☐ Não -----→B2. Durante os últimos 30 dias, o(a) Sr(a) se sentiu com menos energia?☐ Sim☐ Não **(PULE PARA A SEÇÃO C)**

B3. O(a) Sr(a) sabe por que tem se sentido [cansado(a)/com menos energia]?

☐ Sim -----→B3a. Qual é a causa principal? O (a) Sr(a) pode escolher uma opção deste cartão?**Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 02**☐ Problemas de sono☐ Medicamentos☐ Doença física☐ Excesso de trabalho (incluindo tarefas domésticas, cuidar de crianças)☐ Estresse, preocupações ou outras razões psicológicas☐ Exercício físico **(PULE PARA A SEÇÃO C)**☐ Outra☐ Não**Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 02.**B4. Nos últimos 7 dias, em quantos dias o(a) Sr(a) se sentiu [cansado(a)/com menos energia]?☐ 4 dias ou mais☐ 1 a 3 dias☐ nenhum **(PULE PARA A SEÇÃO C)**B5. Nos últimos 7 dias, o(a) Sr(a) se sentiu [cansado(a)/com menos energia], por mais de 3 horas, no total, em algum desses dias? (exclua o tempo gasto dormindo)☐ Sim

[] Não

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

B6. <u>Nos últimos 7 dias</u> , o(a) Sr(a) se sentiu tão [cansado(a) /com menos energia] que precisou se esforçar para realizar as suas atividades?	
☐ Sim, em ao menos uma ocasião	
☐ Não	
B7. <u>Nos últimos 7 dias</u> , o(a) Sr(a) se sentiu [cansado(a) /com menos energia] quando fazia coisas de que gosta?	
☐ Sim, ao menos uma vez	
☐ Não -----→ OU ☐ SE DIZ ESPONTANEAMENTE "NÃO GOSTO DE FAZER NADA"	B8. <u>Nos últimos 7 dias</u> , o(a) Sr(a) se sentiu [cansado(a)/com menos energia] quando fazia coisas de que <u>costumava</u> gostar?
	☐ Sim
	☐ Não
B9. Há quanto tempo o(a) Sr(a) tem se sentido [cansado(a) /com menos energia] como o(a) Sr(a) me descreveu?	
Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.	
☐ Menos que duas semanas	
☐ Entre duas semanas e menos de seis meses	
☐ Entre seis meses e menos de um ano	
☐ Entre um ano e menos de dois anos	
☐ Dois anos ou mais	
Entrevistador(a):RECOLHA O CARTÃO CIS 01.	

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO C

C1. Nos últimos 30 dias, o(a) Sr(a) teve dificuldade para se concentrar no que estava fazendo?

[] Sim, dificuldade de concentração

[] Não

C2. Nos últimos 30 dias o(a) Sr(a) teve problema de memória ou de esquecimento?

[] Sim

[] Não

C3. ENTREVISTADOR(A): SE VERIFICAR QUE C1 = NÃO E C2 = NÃO, PULE PARA A SEÇÃO D

C4. Nos últimos 7 dias, em quantos dias o(a) Sr(a) teve problemas de [concentração / memória]?

[] 4 dias ou mais

[] 1 a 3 dias

[] nenhum **(PULE PARA A SEÇÃO D)**

SE C1 = SIM --> APLIQUE C5 e C6

C5. Nos últimos 7 dias, o(a) Sr(a) conseguiu se concentrar em assistir um programa de TV, ler um jornal ou conversar com alguém sem se distrair?

[] Sim

[] Não, nem sempre

C6. Nos últimos 7 dias, esses problemas de concentração impediram o(a) Sr(a) de fazer coisas que costumava fazer ou gostaria de fazer?

[] Sim

[] Não

SE C2 = SIM ---> APLIQUE C7

Entrevistador(a) LEIA AO(A) PARTICIPANTE: "Anteriormente o(a) Sr(a) disse que tem esquecido coisas"

C7. Nos últimos 7 dias, o(a) Sr(a) esqueceu alguma coisa importante?

[] Sim

[] Não

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

C8. Há quanto tempo o(a) Sr(a) tem tido esses problemas de [concentração/memória] do modo como o(a) Sr(a) me descreveu?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.

☐ Menos que duas semanas

☐ Entre duas semanas e menos de seis meses

☐ Entre seis meses e menos de um ano

☐ Entre um ano e menos de dois anos

☐ Dois anos ou mais

Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 01.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO D

D1. Nas últimas 30 noites, o(a) Sr(a) tem tido problemas em pegar no sono ou voltar a dormir, quando o(a) Sr(a) acorda ou é acordado(a)?

☐ Sim

☐ Não -----→

D2. Nas últimas 30 noites, dormir mais do que costuma, tem sido um problema para o(a) Sr(a)?

☐ Sim

☐ Não **(PULE PARA A SEÇÃO E)**

D3. Nas últimas 7 noites, em quantas delas o(a) Sr(a) teve problemas de sono?

☐ 4 noites ou mais

☐ 1 a 3 noites

☐ nenhuma **(PULE PARA A SEÇÃO E)**

D4. O(a) Sr(a) sabe por que tem tido problemas de sono?

☐ Sim -----→

D4a. O(a) Sr(a) poderia olhar este cartão e dizer a principal causa desse problema?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 03.

☐ barulhos

☐ trabalho em turnos variados / muito ocupado para dormir

☐ doença/ desconforto

☐ preocupações

☐ necessidade de ir ao banheiro

☐ ter que fazer algo (p. ex. cuidar de criança)

☐ cansaço

☐ medicamento

☐ outras

☐ Não

Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 03.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SE D1 = SIM APLICAR D5 à D7

D5. Dentre as últimas 7 noites, pense naquela em que o(a) Sr(a) dormiu menos. Quanto tempo o(a) Sr(a) gastou tentando dormir? Considere todas as vezes que o Sr(a) acordou e/ou foi acordado(a). (somente inclua o tempo gasto tentando pegar no sono)

☐ menos que 15 minutos **(PULE PARA A SEÇÃO E)**

☐ de 15 minutos a menos de 1 hora

☐ de 1 hora a menos de 3 horas

☐ 3 horas ou mais ----- →

D6. Nas últimas 7 noites, em quantas delas o(a) Sr(a) gastou 3 horas ou mais tentando dormir?

☐ 4 noites ou mais

☐ 1 a 3 noites

☐ nenhuma

D7. Nas últimas 7 noites, o(a) Sr(a) acordou mais de 2 horas antes do que precisava e então não conseguiu voltar a dormir?

☐ Sim **(PULE PARA A QUESTÃO D10)**

☐ Não **(PULE PARA A QUESTÃO D10)**

SE D2 = SIM APLIQUE D8

D8. Dentre as últimas 7 noites, pense na noite que o(a) Sr(a) dormiu mais. Quanto tempo a mais o(a) Sr(a) dormiu comparado ao que normalmente dorme?

(Exclua o tempo gasto tentando pegar no sono)

☐ menos que 15 minutos **(PULE PARA A SEÇÃO E)**

☐ de 15 minutos a menos de 1 hora

☐ de 1 hora a menos de 3 horas

☐ 3 horas ou mais ----- →

D9. Nas últimas 7 noites, em quantas delas o(a) Sr(a) dormiu 3 horas ou mais além do que costuma dormir?

☐ 4 noites ou mais

☐ 1 a 3 noites

☐ nenhuma

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

D10. Há quanto tempo o (a) Sr(a) tem tido esses problemas de sono do modo como o(a) Sr(a) me descreveu?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.

☐ Menos que duas semanas

☐ Entre duas semanas e menos de seis meses

☐ Entre seis meses e menos de um ano

☐ Entre um ano e menos de dois anos

☐ Dois anos ou mais

Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 01.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO E

E1. Às vezes, as pessoas tornam-se impacientes ou irritáveis, mesmo sem demonstrar.

Nos últimos 30 dias, o(a) Sr(a) tem se sentido impaciente ou irritável com as pessoas ao seu redor?

☐ Sim/Não mais que de costume

☐ Não -----→

E2. Durante os últimos 30 dias, o(a) Sr(a) ficou irritado(a) ou furioso(a) com coisas que agora lhe parecem triviais (sem importância)?

☐ Sim

☐ Não **(PULE PARA A SEÇÃO F)**

E3. Nos últimos 7 dias, em quantos dias o(a) Sr(a) ficou [impaciente ou irritado(a)/furioso(a)]?

☐ 4 dias ou mais

☐ 1 a 3 dias

☐ nenhum **(PULE PARA A SEÇÃO F)**

E4. Nos últimos 7 dias, que coisas o(a) deixaram [impaciente ou irritado(a)/furioso(a)]?

Resposta:

E5. Em algum dos últimos 7 dias, o(a) Sr(a) ficou [impaciente ou irritado(a)/furioso(a)] por mais de 1 hora no total?

☐ Sim

☐ Não

E6. Durante os últimos 7 dias, o(a) Sr(a) ficou tão [impaciente ou irritado(a)/furioso(a)] que teve vontade de gritar com alguém mesmo que não tenha de fato gritado?

☐ Sim

☐ Não

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

E7. Nos últimos 7 dias, o(a) Sr(a) teve discussão, “bate-boca”, desentendimento ou descontrole com alguém?

☐ Sim -----→

E7a. Nos últimos 7 dias, isso aconteceu uma ou mais de uma vez?

☐ Uma vez --→

E8. O(a) Sr(a) acha que houve justificativa para isso?

☐ Sim, justificado **(PULE PARA AQUESTÃO E10)**

☐ Não, não justificado **(PULE PARA AQUESTÃO E10)**

☐ Mais que uma vez →

E9. O(a) Sr(a) acha que houve justificativa em todos os casos?

☐ Sim

☐ Não, ao menos uma vez não foi justificado

☐ Não

E10. Há quanto tempo o(a) Sr(a) tem se sentido [impaciente ou irritado(a)/furioso(a)], do modo como o(a) Sr(a) me descreveu?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.

☐ Menos que duas semanas

☐ Entre duas semanas e menos de seis meses

☐ Entre seis meses e menos de um ano

☐ Entre um ano e menos de dois anos

☐ Dois anos ou mais

Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 01.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto

**SEÇÃO F**

F1. Muitas pessoas ficam preocupadas com sua saúde física.

Nos últimos 30 dias, o(a) Sr(a) ficou preocupado(a) de alguma forma com sua saúde física?

☐ Sim, preocupado(a)☐ Não -----→

F2. Durante os últimos 30 dias, o(a) Sr(a) ficou preocupado(a) pensando que poderia ter um problema sério de saúde física?

☐ Sim☐ Não **(PULE PARA A SEÇÃO G)**

F3. Pense sobre os últimos 7 dias, em quantos dias o(a) Sr(a) ficou preocupado(a) [com sua saúde física/ pensando que poderia ter um problema sério de saúde]?

☐ 4 dias ou mais☐ 1 a 3 dias☐ nenhum **(PULE PARA A SEÇÃO G)**

F4. Nos últimos 7 dias, tendo em vista seu real estado de saúde, o(a) Sr(a) considera que tem se preocupado demais com sua saúde?

☐ Sim☐ NãoF5. Nos últimos 7 dias, essa preocupação foi: **(LEIA AS ALTERNATIVAS)**☐ muito desagradável☐ um pouco desagradável☐ ou não foi desagradável?

F6. Nos últimos 7 dias, o(a) Sr(a) foi capaz de tirar essas preocupações com sua saúde do seu pensamento, pelo menos uma vez, fazendo outra coisa?

☐ Sim☐ Não, não conseguiu tirar essas preocupações nem uma vez

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

F7. Há quanto tempo o(a) Sr(a) tem se preocupado com sua saúde física do modo como o(a) Sr(a) me descreveu?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.

☐ Menos que duas semanas

☐ Entre duas semanas e menos de seis meses

☐ Entre seis meses e menos de um ano

☐ Entre um ano e menos de dois anos

☐ Dois anos ou mais

Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 01.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO G

G1. Às vezes, as pessoas se sentem tristes ou deprimidas.

Nos últimos 30 dias, o(a) Sr(a) tem se sentido triste ou deprimido(a)?

☐ Sim ----- →

G4. Nos últimos 7 dias, o(a) Sr(a) se sentiu triste ou deprimido(a)?

☐ Sim☐ Não☐ Não

G2. Nos últimos 30 dias, o(a) Sr(a) foi capaz de gostar ou se interessar pelas coisas como costumava fazer?

☐ Sim☐ Não, não me divirto ou me interesseo ----- →

G5. Nos últimos 7 dias, o(a) Sr(a) foi capaz de gostar ou se interessar pelas coisas como costumava fazer?

☐ Sim☐ Não, não me divirto ou me interesseo**G3. Entrevistador(a):
VERIFIQUE****SE G1 = NÃO E G2 = SIM, PULE PARA A SEÇÃO I****SE G1 = NÃO E G5 = SIM, PULE PARA A SEÇÃO I****SE G4 = NÃO E G2 = SIM, PULE PARA A SEÇÃO I****SE G4 = NÃO E G5 = SIM, PULE PARA A SEÇÃO I****SE G4= SIM OU G5= NÃO, APLIQUE G6**

G6. Nos últimos 7 dias, em quantos dias o (a) Sr(a) se sentiu [triste, deprimido(a)/incapaz de gostar ou se interessar pelas coisas]?

☐ 4 dias ou mais☐ 2 a 3 dias☐ 1 dia

G7. Nos últimos 7 dias, o(a) Sr(a) se sentiu [triste, deprimido(a)/incapaz de gostar ou se interessar pelas coisas], por mais de 3 horas no total em algum dia?

☐ Sim☐ Não

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

G8. Nos últimos 7 dias, o que deixou o (a) Sr(a) [triste, deprimido(a)/incapaz de gostar ou se interessar pelas coisas]? O(a) Sr(a) pode escolher uma ou mais opções deste cartão?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 04.

(a) múltipla escolha		(b) Qual a <u>principal</u> razão?
Situações com membros da sua família	[]	[]
Relacionamento com esposo(a)/companheiro(a)	[]	[]
Relacionamentos com amigos	[]	[]
Moradia	[]	[]
Problemas financeiros	[]	[]
Sua saúde física	[]	[]
Sua saúde mental	[]	[]
Trabalho /estudo ou falta de trabalho	[]	[]
Problemas com a justiça	[]	[]
Problemas políticos /notícias	[]	[]
Outros	[]	[]
Não sabe informar / nada em especial	[]	[]

Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 04.

G9. Nos últimos 7 dias, quando o(a) Sr(a) estava [triste, deprimido(a)/se sentindo incapaz de gostar ou se interessar pelas coisas], alguma vez o(a) Sr(a) se sentiu mais alegre quando algo de bom aconteceu ou quando estava acompanhado?

[] Sim, pelo menos uma vez

[] Não

G10. Há quanto tempo o(a) Sr(a) tem se sentido [triste, deprimido(a)/incapaz de gostar ou se interessar pelas coisas] do modo como o(a) Sr(a) me descreveu?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.

[] Menos que duas semanas

[] Entre duas semanas e menos de seis meses

[] Entre seis meses e menos de um ano

[] Entre um ano e menos de dois anos

[] Dois anos ou mais

Entrevistador(a):RECOLHA O CARTÃO CIS 01.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO H

**Entrevistador(a): APLIQUE ESTA SEÇÃO SE O(A) PARTICIPANTE RESPONDEU G4= SIM OU G5= NÃO
SE NÃO, PASSE PARA A PRÓXIMA SEÇÃO I**

H1. Agora gostaria de perguntar sobre quando o (a) Sr (a) se sentiu [triste, deprimido (a) / incapaz de gostar ou se interessar pelas coisas].

Nos últimos 7 dias, o (a) Sr (a) se sentiu pior: **(LEIA AS ALTERNATIVAS)**

☐ durante a manhã

☐ no final do dia

☐ ou não teve diferença

H2. Muitas pessoas sentem que, quando estão [tristes, deprimidas/se sentem incapazes de gostar ou se interessar pelas coisas] têm seu desejo sexual modificado. Nos últimos 30 dias, o (a) Sr(a) acha que seu desejo sexual: **(LEIA AS ALTERNATIVAS)**

☐ aumentou

☐ diminuiu

☐ ou está o mesmo de sempre

☐ RESPOSTA ESPONTÂNEA – não se aplica

H3a. Nos últimos 7 dias, quando o(a) Sr(a) se sentiu [triste, deprimido(a) / incapaz de gostar ou se interessar pelas coisas], o(a) Sr(a) estava tão inquieto(a) que não conseguia ficar sentado(a)?

☐ Sim

☐ Não

H3b. Nos últimos 7 dias, quando o(a) Sr(a) se sentiu [triste, deprimido(a) / incapaz de gostar ou se interessar pelas coisas] o(a) Sr(a) estava fazendo coisas mais lentamente como, por exemplo, caminhar mais devagar?

☐ Sim

☐ Não

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

H3c. <u>Nos últimos 7 dias</u> , quando o(a) Sr(a) se sentiu [triste, deprimido(a) / incapaz de gostar ou se interessar pelas coisas] o(a) Sr(a) estava falando menos do que o normal?	
☐ Sim	
☐ Não	
H4. Agora, pense <u>nos últimos 7 dias</u> . Em pelo menos uma ocasião, o(a) Sr(a) se sentiu culpado(a) por alguma coisa que não deu certo, mesmo não sendo sua culpa?	
☐ Sim, ao menos uma vez	
☐ Não	
H5. <u>Durante os últimos 7 dias</u> , o(a) Sr(a) tem sentido que não é tão bom(boa) quanto as outras pessoas?	
☐ Sim	
☐ Não	
H6. <u>Durante os últimos 7 dias</u> , o(a) Sr(a) se sentiu completamente sem esperança, por exemplo, em relação ao seu futuro?	
☐ Sim	
☐ Não	
H7. Entrevistador(a): VERIFIQUE	Se H4 = NÃO E H5 = NÃO E H6 = NÃO, PULE PARA SEÇÃO I
	SE H4 = SIM OU H5 = SIM OU H6 = SIM, APLIQUE H8
H8. <u>Nos últimos 7 dias</u> , o(a) Sr(a) sentiu que não vale a pena viver?	
☐ Sim	
☐ Sim, mas não nos últimos 7 dias (PULE PARA SEÇÃO I)	
☐ Não (PULE PARA SEÇÃO I)	
H9. <u>Nos últimos 7 dias</u> , o(a) Sr(a) pensou em se matar?	
☐ Sim	
☐ Sim, mas não nos últimos 7 dias (PULE PARA SEÇÃO I)	
☐ Não (PULE PARA SEÇÃO I)	

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

H9a. O(a) Sr(a) falou com seu médico sobre isso (pensar em se matar)?

☐ Sim

☐ Sim, mas falou com outra pessoa

☐ Não

ID NUMERO:							
------------	--	--	--	--	--	--	--

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO I		
Agora, gostaria de perguntar sobre preocupações.		
I1. <u>Nos últimos 30 dias</u> , o (a) Sr(a) notou que estava mais preocupado(a) com as coisas do que deveria estar?		
☐ Sim, preocupado		
☐ Não ---->	I2. <u>Nos últimos 30 dias</u> , o(a) Sr(a) teve alguma preocupação?	
	☐ Sim	
	☐ Não (PULE PARA SEÇÃO J)	
I3 (a). O (a) Sr(a) pode olhar esse cartão e me dizer o que tem deixado o(a) Sr(a) preocupado(a) <u>nos últimos 30 dias</u> ? Escolha uma ou mais opções desse cartão.		
Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 04.		
(a) múltipla escolha		(b) Qual a <u>principal</u> razão?
Situações com membros da sua família	☐	☐
Relacionamento com esposo(a)/companheiro(a)	☐	☐
Relacionamentos com amigos	☐	☐
Moradia	☐	☐
Problemas financeiros	☐	☐
Sua saúde física	☐	☐ PULE PARA SEÇÃO J
Sua saúde mental	☐	☐
Trabalho /estudo ou falta de trabalho	☐	☐
Problemas com a justiça	☐	☐
Problemas políticos /notícias	☐	☐
Outros	☐	☐
Não sabe informar / nada em especial	☐	☐
Entrevistador(a):RECOLHA O CARTÃO CIS 04.		

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

Para as próximas perguntas, gostaria que o (a) Sr(a) pensasse sobre as preocupações (excluindo aquelas relacionadas à sua saúde física) [que o(a) Sr(a) teve].

I6. Nos últimos 7 dias, em quantos dias o(a) Sr(a) teve essas preocupações (excluindo preocupações referentes à sua saúde física)

☐ 4 dias ou mais

☐ 1 a 3 dias

☐ nenhum **(PULE PARA A SEÇÃO J)**

I7. Tendo em vista sua situação atual, o (a) Sr(a) considera que tem se preocupado demais? (excluindo preocupações referentes à sua saúde física)

☐ Sim

☐ Não

I8. Nos últimos 7 dias, essas preocupações (excluindo aquelas referentes à sua saúde física) foram: **(LEIA AS ALTERNATIVAS)**

☐ muito desagradáveis

☐ um pouco desagradáveis

☐ ou não foram desagradáveis?

I9. Nos últimos 7 dias, o (a) Sr(a) esteve preocupado(a) (excluindo preocupações referentes à sua saúde física) por mais de 3 horas no total, em algum dia?

☐ Sim

☐ Não

I10. Há quanto tempo o(a) Sr(a) tem se preocupado com as coisas do modo como o(a) Sr(a) me descreveu?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.

☐ Menos que duas semanas

☐ Entre duas semanas e menos de seis meses

☐ Entre seis meses e menos de um ano

☐ Entre um ano e menos de dois anos

☐ Dois anos ou mais

Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 01.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO JJ1. Nos últimos 30 dias, o(a) Sr(a) tem se sentido ansioso(a) ou nervoso(a)?☐ Sim, ansioso(a) ou nervoso(a)☐ Não ---→J2. Nos últimos 30 dias, o(a) Sr(a) notou alguma vez que seus músculos estavam tensos ou que o(a) Sr(a) não conseguia relaxar?☐ Sim☐ Não

Algumas pessoas têm fobias, isto é ficam nervosas ou desconfortáveis com coisas ou em situações específicas em que não existe um perigo real. Por exemplo, elas podem ficar nervosas falando ou comendo na frente de estranhos, quando estão longe de casa ou em salas cheias ou podem ter medo de altura. Outros se sentem nervosos ao ver coisas como sangue ou aranhas.

J3. Nos últimos 30 dias, o(a) Sr (a) se sentiu [ansioso(a) ou nervoso(a)/tenso(a)] com alguma coisa ou situação específica em que não existia perigo real?☐ Sim☐ Não (**E J1 = NÃO E J2=NÃO, PULE PARA SEÇÃO K**)**J4. Entrevistador(a):
VERIFIQUE****Se J1 = SIM OU J2 = SIM E J3 = SIM, APLIQUE J5****Se J1 = SIM OU J2 = SIM E J3 =NÃO pule para J6**J5. Nos últimos 30 dias, quando o (a) Sr(a) se sentiu [ansioso(a) ou nervoso(a)/ tenso(a)], isso foi sempre ocasionado por alguma situação ou coisa específica ou às vezes o(a) Sr(a) sentiu [ansiedade/ nervosismo/tensão] de uma maneira geral?☐ Sempre ocasionada por uma fobia (**PULE PARA SEÇÃO K**)☐ Às vezes sentiu ansiedade em geralJ6. As próximas perguntas estão apenas relacionadas com [ansiedade ou nervosismo/ tensão] de uma maneira geral.

[Vou perguntar sobre a ansiedade ocasionada por fobia de coisa ou situação específica mais tarde.]

Em quantos, dos últimos 7 dias, o (a) Sr(a) sentiu [ansiedade/nervosismo/ tensão] de uma maneira geral?☐ 4 dias ou mais☐ 1 a 3 dias☐ nenhum (**PULE PARA SEÇÃO K**)

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

J8. Nos últimos 7 dias, essa [ansiedade ou nervosismo/ tensão] foi: **(LEIA AS ALTERNATIVAS)**

☐ muito desagradável

☐ um pouco desagradável

☐ ou não foi desagradável?

J9. Nos últimos 7 dias, quando o (a) Sr(a) se sentiu [ansioso(a) ou nervoso(a)/ tenso(a)] o(a) Sr(a) teve algum dos sintomas que aparecem neste cartão?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 05.

☐ Sim ---->

J9a. Qual desses sintomas o(a) Sr(a) teve quando se sentiu [ansioso(a)/ nervoso(a)/ tenso(a)]? É possível escolher mais de uma opção.

☐ coração acelerado ou palpitações

☐ mãos suadas ou tremendo

☐ tontura

☐ falta de ar

☐ sensação estranha no estômago

☐ boca seca

☐ náusea ou vontade de vomitar

☐ Não

Entrevistador(a):RECOLHA O CARTÃO CIS 05.

J10. Nos últimos 7 dias, o(a) Sr(a) se sentiu [ansioso(a)/nervoso(a)/tenso(a)] por mais de 3 horas, no total, em algum desses dias?

☐ Sim

☐ Não

J11. Há quanto tempo o (a) Sr (a) tem sentido [ansiedade / nervosismo/ tensão] de maneira geral do modo como o (a) Sr(a) me descreveu?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.

☐ Menos que duas semanas

☐ Entre duas semanas e menos de seis meses

☐ Entre seis meses e menos de um ano

☐ Entre um ano e menos de dois anos

☐ Dois anos ou mais

Entrevistador(a):RECOLHA O CARTÃO CIS 01.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO K**K1. ENTREVISTADOR: VERIFIQUE SE J3 = NÃO → APLIQUE K2**

Algumas vezes, as pessoas evitam uma situação ou coisa específica porque têm fobia disso. Por exemplo, algumas pessoas evitam comer em público ou evitam ir a lugares cheios porque isso as deixaria nervosas ou ansiosas.

K2. Nos últimos 30 dias, o (a) Sr(a) evitou alguma situação ou coisa porque isso lhe deixaria ansioso(a) ou nervoso(a), mesmo não havendo um perigo real?

☐ Sim ----→

K3 (b). O (a) Sr(a) pode olhar esse cartão e me dizer qual dessas situações ou coisas listadas o(a) Sr(a) evitou mais nos últimos 30 dias? É possível escolher mais de uma opção.

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 06.

☐ Lugares públicos ou multidões, incluindo viajar sozinho ou estar longe de casa

☐ Lugares fechados

☐ Situação social, incluindo comer ou falar em público, sendo olhado ou observado

☐ Ver sangue ou ferimentos

☐ Qualquer outra situação específica (incluindo insetos, aranhas, alturas)

☐ Outros. Especifique:

☐ Não (**PULE PARA SEÇÃO L**)

Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 06.

SE J3 = SIM

K3 (a). O (A) Sr (a) pode olhar esse cartão e me dizer qual dessas situações ou coisas listadas deixou o(a) Sr(a) mais [ansioso(a)/ nervoso (a)/tenso(a)] nos últimos 30 dias? É possível escolher mais de uma opção.

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 06.

☐ Lugares públicos ou multidões, incluindo viajar sozinho ou estar longe de casa

☐ Lugares fechados

☐ Situação social, incluindo comer ou falar em público, sendo olhado ou observado

☐ Ver sangue ou ferimentos

☐ Qualquer outra situação específica (incluindo insetos, aranhas, alturas)

☐ Outros. Especifique:

Entrevistador(a):RECOLHA O CARTÃO CIS 06.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

K4. NOS ÚLTIMOS 7 DIAS, quantas vezes o (a) Sr (a) se sentiu [ansioso(a)/nervoso(a)/tenso(a)] em [SITUAÇÃO OU COISA] ?	
☐ 4 vezes ou mais	
☐ 1 a 3 vezes	
☐ nenhuma (APLIQUE A QUESTÃO K6)	
K5. <u>Nos últimos 7 dias</u> , na(s) ocasião(s) quando o (a) Sr (a) se sentiu [ansioso (a)/nervoso(a)/tenso(a)], o(a) Sr(a) teve algum dos sintomas deste cartão?	
Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 05.	
☐ Sim ---->	K5a. Qual desses sintomas o(a) Sr(a) teve quando se sentiu [ansioso(a)/nervoso(a)/tenso(a)]? É possível escolher mais de uma opção.
	☐ coração acelerado ou palpitações
	☐ mãos suadas ou tremendo
	☐ tontura
	☐ falta de ar
	☐ sensação estranha no estômago
	☐ boca seca
	☐ náusea ou vontade de vomitar
☐ Não	
Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 05.	
K6. <u>Nos últimos 7 dias</u> , o (a) Sr(a) <u>evitou</u> alguma situação ou coisa porque ela poderia fazer o(a) Sr(a) se sentir [ansioso(a)/nervoso(a)/tenso(a)] mesmo não havendo um perigo real?	
☐ Sim ---->	K7. <u>Nos últimos 7 dias</u> , quantas vezes, o (a) Sr(a) evitou essa situação ou coisa?
	☐ 1 a 3 vezes
	☐ 4 vezes ou mais
	☐ nenhuma
☐ Não	

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

K8 - Há quanto tempo o(a) Sr(a) tem tido essas sensações sobre essas [situações/coisas] do modo como o(a) Sr(a) me descreveu?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.

☐ Menos que duas semanas

☐ Entre duas semanas e menos de seis meses

☐ Entre seis meses e menos de um ano

☐ Entre um ano e menos de dois anos

☐ Dois anos ou mais

Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 01.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO L

ESTA SEÇÃO SÓ DEVE SER PREENCHIDA SE O(A) PARTICIPANTE RESPONDEU: J1 = SIM OU J2 = SIM OU J3 = SIM

L1. Pense nos últimos 30 dias. Sua ansiedade ou tensão ficou tão intensa que o (a) Sr(a) ficou em pânico, por exemplo, sentiu que iria desmaiar ou perder o controle a não ser que o(a) Sr(a) fizesse algo em relação a isso?

☐ Sim

☐ Não **(PULE PARA SEÇÃO M)**

L2. Nos últimos 7 dias, quantas vezes isso aconteceu?

☐ uma vez

☐ mais que uma vez

☐ nenhuma **(PULE PARA SEÇÃO M)**

L3. Nos últimos 7 dias, esse(s) ataque(s) de pânico foi(ram): **(LEIA AS ALTERNATIVAS)**

☐ um pouco desagradável(is) ou desconfortável(is)

☐ muito desagradável(is) ou intolerável(is)?

L4. [Esse ataque de pânico/o pior desses ataques de pânico], durou mais que 10 minutos?

☐ Sim

☐ Não

L5. O(a) Sr(a) fica praticamente sem ansiedade entre esses ataques de pânico?

☐ Sim

☐ Não

(SOMENTE PARA AQUELES QUE RESPONDEREM SIM EM K3A)

L6. Esses ataques de pânico são sempre causados por **[SITUAÇÃO OU COISA DA QUESTÃO K3]?**

☐ Sim

☐ Não

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

L7. Há quanto tempo o (a) Sr (a) tem tido esses ataques de pânico do modo como o(a) Sr(a) me descreveu?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.

☐ Menos que duas semanas

☐ Entre duas semanas e menos de seis meses

☐ Entre seis meses e menos de um ano

☐ Entre um ano e menos de dois anos

☐ Dois anos ou mais

Entrevistador(a):RECOLHA O CARTÃO CIS 01.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO M

M1. Nos últimos 30 dias, o (a) Sr(a) notou que fazia coisas repetidas vezes mesmo sabendo que já tinha feito essas coisas, por exemplo, verificando se a torneira estava fechada ou se lavando?

☐ Sim

☐ Não **(PULE PARA SEÇÃO N)**

M2. Em quantos dos últimos 7 dias, o(a) Sr(a) notou que repetia coisas que já tinha feito?

☐ 4 dias ou mais

☐ 1 a 3 dias

☐ nenhum **(PULE PARA SEÇÃO N)**

M3. Nos últimos 7 dias, que tipo de coisa o(a) Sr(a) ficou repetindo várias vezes?

Resposta:

M4. Durante os últimos 7 dias, o(a) Sr(a) tentou parar de repetir **[COMPORTAMENTO/ QUALQUER UMA DESSAS COISAS]**?

☐ Sim

☐ Não

M5. Nos últimos 7 dias, repetir **[COMPORTAMENTO/QUALQUER UMA DESSAS COISAS]** lhe deixou incomodado (a) ou chateado(a) com o(a) Sr(a) mesmo(a)?

☐ Sim, incomodado ou chateado

☐ Não

M6. **(APENAS SE MAIS DE UMA COISA EM M3)**

Pense nos últimos 7 dias, qual dessas coisas que o (a) Sr (a) mencionou o(a) Sr(a) repetiu o maior número de vezes?

Resposta:

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

M7. Nos últimos 7 dias, quantas vezes o(a) Sr(a) repetiu [**COMPORTAMENTO**] quando o(a) Sr(a) já tinha feito isso?

☐ 3 ou mais repetições

☐ 2 repetições

☐ 1 repetição

M8. Há quanto tempo o(a) Sr(a) tem repetido [**COMPORTAMENTO/QUALQUER DAS COISAS MENCIONADAS**] do modo como o(a) Sr(a) me descreveu ?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.

☐ Menos que duas semanas

☐ Entre duas semanas e menos de seis meses

☐ Entre seis meses e menos de um ano

☐ Entre um ano e menos de dois anos

☐ Dois anos ou mais

Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 01.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO N

N1. Nos últimos 30 dias, o(a) Sr(a) teve alguns pensamentos ou ideias que, por ficarem vindo várias vezes, eram desagradáveis e nos quais o(a) Sr(a) preferia não pensar, mas que mesmo assim continuavam voltando à sua mente?

☐ Sim

☐ Não **(PULE PARA SEÇÃO O)**

N2. Só para esclarecer, é o mesmo pensamento ou ideia que fica retornando várias vezes ou o(a) Sr(a) está se preocupando com alguma coisa em geral?

☐ mesmo pensamento

☐ preocupação geral **(PULE PARA SEÇÃO O)**

N3. Que pensamentos ou ideias ficam vindo à sua mente de maneira desagradável?

Resposta:

N4. Nos últimos 7 dias, em quantos dias o (a) Sr(a) teve esses pensamentos?

☐ 4 dias ou mais

☐ 1 a 3 dias

☐ nenhum **(PULE PARA SEÇÃO O)**

N5. Durante os últimos 7 dias, o(a) Sr(a) tentou parar de pensar em algum desses pensamentos?

☐ Sim

☐ Não

N6. Nos últimos 7 dias, o (a) Sr(a) se incomodou ou se chateou com o(a) Sr(a) mesmo por ter tido esses pensamentos?

☐ Sim, incomodado ou chateado

☐ Não

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

N7. Nos últimos 7 dias, o episódio mais longo desses pensamentos durou: **(LEIA AS ALTERNATIVAS)**

☐ 15 minutos ou mais

☐ ou menos do que isto?

N8. Há quanto tempo o(a) Sr(a) tem tido esses pensamentos do modo como o(a) Sr(a) me descreveu?

Entrevistador(a): ENTREGUE O CARTÃO CIS 01.

☐ Menos que duas semanas

☐ Entre duas semanas e menos de seis meses

☐ Entre seis meses e menos de um ano

☐ Entre um ano e menos de dois anos

☐ Dois anos ou mais

Entrevistador(a): RECOLHA O CARTÃO CIS 01.

ID NUMERO:

Versão: 22/03/2017

SEÇÃO O

Agora, gostaria de perguntar como todas essas coisas que o (a) Sr(a) me contou têm afetado o(a) Sr(a) de uma maneira geral.

O1. Nos últimos 7 dias, **[ISSO/ESSAS COISAS]** que o (a) Sr(a) tem sentido chegaram realmente a impedir o(a) Sr(a) de continuar fazendo coisas que costumava fazer ou que gostaria de fazer?

[] Sim ---->	Oa. <u>Nos últimos 7 dias</u> , [ISSO/ESSAS COISAS] que o (a) Sr(a) tem sentido o(a) impediu(ram) de fazer coisas, uma ou mais que uma vez?
	[] Uma vez
	[] Mais de uma vez
[] Não ---->	Ob. [ISSO/ ESSAS COISAS] que o (a) Sr(a) tem sentido, tornou as coisas mais difíceis mesmo que tenha conseguido fazer tudo?
	[] Sim
	[] Não

Anexo 2. Aprovação do comitê de ética da ELSA-BRASIL

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

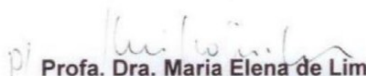
Parecer nº. ETIC 186/06

Interesse: Prof. (a) Sandhi Maria Barreto
Depto. De Medicina Preventiva e Social
Faculdade de Medicina -UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 28 de junho de 2006 o projeto de pesquisa intitulado “**ELSA - Estudo longitudinal da saúde do adulto.**” bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

Anexo 3. Aprovação do comitê de ética da onda 3 do ELSA-BRASIL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto - ELSA Brasil UFMG

Pesquisador: Sandhi Maria Barreto

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 47125015.4.1001.5149

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: Departamento de Ciência e Tecnologia
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS
MINISTERIO DA EDUCACAO
FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS - FINEP
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.901.617

Apresentação do Projeto:

"Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto - ELSA Brasil UFMG"

Trata-se de estudo de coorte multicêntrico, com amostra de 15000 funcionários não terceirizados de instituições de ensino superior e de pesquisa, com idade entre 35 e 74 anos. Será realizada entrevista face-a-face com utilização de questionário padronizado, além de medidas (peso, altura, pressão arterial, circunferência de cintura e quadril), exames de urina e sangue (hemograma, glicemia em jejum e teste de tolerância e glicose, creatinina, dosagem de lipídios, hormônios associados ao diabetes ou a doença cardiovascular e prova de atividade inflamatória, ultrassom do abdome e coração, eletrocardiograma, índice tornozelo braquial, velocidade da onda do pulso e retinografia. Em seu primeiro triênio, abordará: antecedentes sócio-ambientais do diabetes e das doenças cardiovasculares; processos biológicos proximais; inflamação crônica, disfunção endotelial, deposição de gordura abdominal e ectópica, disfunção de células beta, alterações cardíacas funcionais e anatômicas e aterosclerose. Também armazenará amostras biológicas e preparará as bases para o seguimento dos participantes.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coop@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.901.617

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Ao investigar coorte de 15 mil funcionários de instituições públicas de ensino superior e pesquisa almeja-se:

- (1) estimar a incidência do diabetes e das doenças cardiovasculares e estudar sua história natural;
- (2) Investigar associações entre fatores biológicos, comportamentais, ambientais, ocupacionais, psicológicos e sociais relacionados a essas doenças e às complicações decorrentes, buscando compor modelo causal que contemple suas inter-relações;
- (3) descrever a evolução temporal desses fatores e os determinantes dessa evolução;
- (4) identificar modificadores de efeito das associações observadas;
- (5) identificar diferenciais nos padrões de risco entre os centros participantes que possam expressar variações regionais relacionadas a essas doenças no país.

Objetivos Secundários:

- (1) explorar hipóteses de inter-relações entre os fatores estudados e outras doenças relevantes, incluindo neoplasias malignas;
- (2) desenvolver, testar, e validar novos métodos e instrumentos para identificar e mensurar exposições e desfechos relevantes;
- (3) formar pessoal qualificado em pesquisa epidemiológica de doenças crônicas;
- (4) manter a vigilância da coorte e do banco de dados de modo a facilitar o estudo de novas hipóteses e fatores associados à incidência e ao prognóstico dessas doenças,
- (5) estocar material biológico, para estudos futuros com diversos tipos de marcadores relacionados à inflamação, coagulação, disfunção endotelial, resistência à insulina, obesidade central, estresse e fatores de risco tradicionais, bem como prover a extração de DNA, para exames genéticos futuros.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequadamente avaliados de acordo com o parecer Nº 1.160.939 datado em 28/07/2015

Riscos: Inerentes a coleta de exames complementares e aplicação de questionários.

Benefícios: Acesso aos resultados dos exames realizados.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.901.617

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa multicêntrica prospectiva nacional relevante para a Medicina, especialmente Cardiologia, Endocrinologia, Ortopedia, Reumatologia e Oncologia.

Os pesquisadores vem por meio deste informar que, o protocolo original do "Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto" (ETIC 186/06, aprovado em 28 de junho de 2006) prevê em seu desenho o acompanhamento da coorte após o estudo de linha de base. Tendo em vista o pleno alcance dos objetivos estabelecidos, a presente emenda refere-se à inclusão de exames na terceira etapa de obtenção dos dados (Onda 3), que tem seu início previsto para fevereiro de 2017.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequadamente listados, de acordo com o parecer Nº 1.160.939 datado em 28/07/2015

- 1- Folha de Rosto (devidamente preenchida e assinada pela coordenadora da pesquisa e pela Gerente de atenção à Saúde do HC-UFMG filial EBSERH)
- 2- Projeto de Pesquisa ELSA
- 3- TCLE - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- 4- Aprovação COEP UFMG: Convênio ref. 4241/05 firmado entre a Universidade e a FINEP: autorização para gestão de projetos/ contratos aprovado pelo Diretor da FMUFMG e "ad referendum" pelo Departamento de Medicina Preventiva e Social.
- 5- Aprovação CONEP: carta número 976 CONEP/CNS/MS datada de 04/08/2006.
- 6- Emenda ELSA - onda 2_adendo ME UFMG COEP
- 7- Projeto Validação OA-COEP: Projeto de validação e comparação de diferentes métodos de classificar a osteoartrite de joelhos e mãos e suas correlações com dor e função.
- 8- Emenda ELSA Avaliação técnica radiográfica 18-10-12.
- 9- COEP- Reprodutibilidade RX.
- 10- Coep -Avaliacao Reumatológica (osteoartrite).
- 11- COEP UFMG Onda 2.
- 12- Parecer consubstanciado do Departamento de Medicina Preventiva e Social aprovado "ad referendum" em 13/07/2015.
- 13- Ofício com solicitação da Emenda "Função Endotelial com ENDOPAT"
- 14- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE ELSA-ENDO): " Repetição da mensuração da função endotelial pela tonometria arterial periférica".

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 1.901.617

15 - Ofício com solicitação da Emenda "Escore de Calcificação de Artérias coronárias, arco aórtico e artérias carótidas"

16 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE ELSA-CAC): "Mensuração do escore de calcificação das artérias coronárias, arco aórtico e artérias carótidas por meio de imagens de tomografia computadorizada".

17- Parecer Consubstanciado CEP- HU/USP com relato de aprovação do Biorrepositório e inclusão de instituições participantes: INSTITUTO DO CÂNCER DO ESTADO DE SÃO PAULO - ICESP, Hospital do Coração/ Associação do Sanatório Sirio, Hospital Israelita Albert Einstein-SP, Real e Benemerita Associação Portuguesa de Beneficência/SP.

18- Regulamento do funcionamento do Biorrepositório ELSA com relato de Registro CEP- HU/USP

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos favoráveis pela aprovação da emenda ao projeto de pesquisa intitulado: " Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto - ELSA Brasil UFMG", sob a responsabilidade da pesquisadora Sandhi Maria Barreto

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_853620_E2.pdf	16/01/2017 13:39:12		Aceito
Outros	Emenda_ELSA_ONDA3.docx	16/01/2017 13:29:42	Sandhi Maria Barreto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Onda3.doc	16/01/2017 13:27:01	Sandhi Maria Barreto	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 1.901.617

Outros	Emenda_CAC_ELSA_UFMG.docx	14/09/2015 11:35:48	Sandhi Maria Barreto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AprovaDEPE_HCUFMG_EmendasELSA.pdf	14/09/2015 11:34:10	Sandhi Maria Barreto	Aceito
Outros	Emenda_ELSA_onda 2_adendo ME UFMG COEP.doc	07/07/2015 18:08:35		Aceito
Outros	Projeto Validacao OA -COEP.docx	07/07/2015 17:53:54		Aceito
Outros	Emenda_ELSA_Avaliacao tecnica radiografica 18 10 12.doc	07/07/2015 17:53:10		Aceito
Parecer Anterior	COEP UFMG Onda 2.pdf	07/07/2015 17:51:14		Aceito
Outros	COEP_Reprodutibilidade RX.pdf	07/07/2015 17:50:05		Aceito
Outros	Coep_Avaliacao Reumatologica.pdf	07/07/2015 17:49:17		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE MG_2.pdf	07/07/2015 17:44:03		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo de Pesquisa ELSA.pdf	07/07/2015 17:40:39		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE-MG.pdf	07/07/2015 17:39:45		Aceito
Parecer Anterior	Aprovação CONEP.pdf	07/07/2015 17:37:45		Aceito
Parecer Anterior	Aprovação COEP UFMG.pdf	07/07/2015 17:37:25		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto_elsa mg.pdf	07/07/2015 17:34:25		Aceito
Outros	471250154emenda2.pdf	30/01/2017 14:40:14	Vivian Resende	Aceito
Outros	471250154parecer2.pdf	30/01/2017 14:40:22	Vivian Resende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 1.901.617

BELO HORIZONTE, 30 de Janeiro de 2017

Assinado por:
Vivian Resende
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br