

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Márcio Luís Moreira de Souza

Reconhecimento de padrões moleculares, clínicos e imunológicos para criação de algoritmo da suscetibilidade e evolução clínica da Hanseníase baseado em inteligência artificial.

Governador Valadares

2021

Márcio Luís Moreira de Souza

Reconhecimento de padrões moleculares, clínicos e imunológicos para criação de algoritmo da suscetibilidade e evolução clínica da Hanseníase baseado em inteligência artificial.

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora, na área de concentração em Bioquímica e Biologia Molecular, como pré-requisito para obtenção do título de doutor em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Lúcia Alves de Oliveira Fraga

Coorientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Cibele Velloso Rodrigues

Governador Valadares

2021

Ficha catalográfica elaborada através do Modelo Latex do CDC da UFJF
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Márcio Luís Moreira de.

Reconhecimento de padrões moleculares, clínicos e imunológicos para criação de algoritmo da suscetibilidade e evolução clínica da Hanseníase baseado em inteligência artificial. / Márcio Luís Moreira de Souza. – 2021. 117 f. : il.

Orientadora: Lúcia Alves de Oliveira Fraga

Coorientadora: Cibele Velloso Rodrigues

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências da Vida. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2021.

1. Hanseníase. 2. Diagnóstico. 3. Imunologia. 4. Genética. 5. Inteligência artificial. I. Alves de Oliveira Fraga, Lúcia, orient. II. Velloso Rodrigues, Cibele, coorient. III. Título.

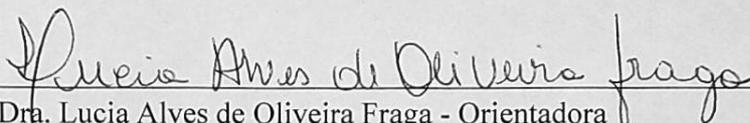
Márcio Luís Moreira de Souza

Reconhecimento de padrões moleculares, clínicos e imunológicos para criação de algoritmo da suscetibilidade e evolução clínica da Hanseníase baseado em inteligência artificial.

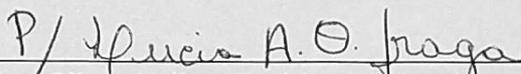
Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 29 de abril de 2021.

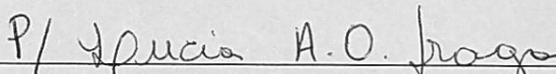
BANCA EXAMINADORA



Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora - *campus* Governador Valadares

P/ 

Dra. Cibele Velloso Rodrigues - Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora - *campus* Governador Valadares

P/ 

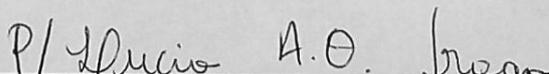
Dra. Roberta Olmo Pinheiro - Membro titular externo
Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro

P/ 

Dra. Maria Aparecida de Faria Grossi - Membro titular externo
Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais

P/ 

Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro – Membro titular interno
Universidade Federal de Juiz de Fora - *campus* Governador Valadares

P/ 

Dr. Leandro Roberto de Macedo - Membro titular interno
Universidade Federal de Juiz de Fora - *campus* Governador Valadares

Dedico este trabalho a minha alma gêmea Cíntia, esposa fiel, amável e incondicional, mãe dedicada de nosso filho Guilherme, materialização de nosso amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, força incomparável que sempre me fez superar minhas individualidades em favor do bem maior. Agradeço, Pai, pelas intuições graciosamente concedidas a mim e a toda equipe que colabora com meu processo de evolução espiritual e acadêmica. Agradeço ao Senhor por ter estado ao meu lado, providencialmente, nos bons e nos maus momentos: por ter me dado a vida; por ter me livrado da morte. Tu és o alfa e o ômega, princípio e fim. Eu Te ofereço a presente tese de doutorado para que seja parte, mesmo que pequenina, de todo o processo científico que nos permite experimentar.

Agradeço à minha amada esposa Cíntia e ao meu primogênito Guilherme, fruto de nosso amor, por estarem ao meu lado, sempre e incondicionalmente, na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, na riqueza e na pobreza, amando-me, respeitando-me e sendo-me fiel em todos os dias da minha vida, para todo o sempre. Juntos, fazemos parte do corpo de Cristo disposto a fazer desse mundo um lugar melhor. Agradeço também aos meus pais, Luís e Celeste, por terem me criado no fogo e no gelo, no amor e na dor, elementos que me tornaram cada vez mais forte e temperado para esse grande desafio chamado vida. Obrigado por toda vossa abnegação em favor de meus sonhos. Agradecê-los adequadamente demandaria certamente um livro inteiro... Agradeço a meu irmão Everton, meu amigo, que sempre esteve em meus pensamentos e ações. De certa forma, eu sentia um desejo de vir a ser teu herói... Agradeço por, em palavras suas, ter alcançado esse lugar de destaque em seu coração. Registro aqui que a recíproca é verdadeira e agradeço a você, meu militar preferido, meu herói, por não ter sido abatido nas batalhas da vida e por estar levando o nome de nossa família rumo a grandes patentes.

Agradeço à família de minha esposa por, há 15 anos, terem me dado suporte, respeito e votos de confiança, independentemente de raça, clero ou qualquer outro rótulo vazio que observamos em certas sociedades. Absorveram meu passado, acreditaram no meu presente e torceram por meu futuro. Com eles pude viver as melhores festas, como se fosse uma espécie de compensação que o destino generosamente me retribuiu em troca de minhas privações passadas. Além disso, por minha esposa, ganhei um segundo pai, meu sogro Geraldo Magelo que sempre esteve ao meu lado, garantindo minha rota segura ao sucesso que é apenas uma palavra que encontramos para definir a plena satisfação com nosso trabalho, família e amigos. Aprendi com meu sogro a ter sucesso. Não consigo imaginar algo que um zeloso pai, em seu melhor dia, no seu melhor humor, possa fazer para um filho que meu sogro não tenha feito por mim. É simplesmente impossível descrever em palavras... Como ao lado de todo grande homem existe uma grande mulher, minha sogra Kleoma não foge à regra. Obrigado pela alegria, emoção e generosidade que vivemos juntos. Obrigado pelo enorme presença em minha vida. Agradeço, imensamente também à vovó Madalena, matriarca dos “bibinhas” e eterno amor do senhor Kleber (‘O bibinha’,

in memoriam) que infelizmente não tive o prazer de conhecê-lo, mas não deixaria de homenageá-lo pelo lindo legado que deixou. Parafraseando: dona Madalena, o meu peito percebeu que o mar é uma gota comparado ao carinho teu. Vocês são demais, pessoal!!

Agradeço a minha orientadora, Dra. Lucia Fraga, que desde do início percebeu valor em minhas empreitadas e vocações, abrindo todas as portas (e janelas) possíveis e imagináveis. Muita das vezes derrubou barreiras e encarou um mundo novo, única e exclusivamente para meu processo evolutivo e acadêmico. Tive o prazer de ser discípulo de uma pessoa de vivacidade invejável e absoluta resiliência, independente de qualquer fator limitante que não raramente surgem nos trâmites da vida acadêmica. Essa mulher gigante sempre arranja forças e soluções geniais para alcançar seus objetivos. Um deles foi me levar para a Califórnia, EUA, para viver maravilhosas experiências na *University of California San Diego* (UCSD), uma das melhores universidades públicas do país, onde tive oportunidade de alavancar minhas competências durante 12 maravilhosos meses. Quanto ao corpo docente da UCSD, sou grato aos professores Dr. Connor Caffrey e Dr. Anthony O'Donoghue, assim como, em especial, sou muito grato ao Dr. Ruben Abagyan, homem de inteligência e currículo invejável que tive a sorte de ter como meu orientador internacional. Agradeço por ter me concedido uma licença do *Molsoft*, notável *software* comercial de sua autoria que será muito útil em minhas futuras pesquisas em bioinformática e demais abordagens *in silico*. Agradeço também à minha coorientadora Cibele, durona, xerife, igualmente incansável e inabalável quanto à busca por excelência. Agradeço por ter coordenado o presente curso de Pós-Graduação com muito esmero e franqueza, de forma inclusiva e multidisciplinar tanto quanto possível a fim de incentivar avanços nos campos de bioquímica e biologia molecular. Resumindo, registro aqui meus agradecimentos a você, Cibele, por combater o bom combate.

Agradeço a todos os amigos que foram muito solícitos em tudo que precisei. Eu realmente me sinto privilegiado por contar com mentes tão generosas e brilhantes em diversas áreas. Agradeço ao Prof. Dr. Frederico Gomides, a Profa. Dra. Michele Antunes e Profa. Dra. Cibele Rodrigues por me aceitarem em suas aulas de graduação a fim de preparar para a acirrada prova de ingresso ao Programa multicêntrico de bioquímica e biologia molecular (PMBqBM). Sendo atualmente um bioestatístico, nem preciso dizer que ser aprovado como aluno de doutorado foi uma tarefa hercúlea e que sem a didática de vocês eu não resgataria conceitos adormecidos, senão completamente esquecidos, em minha cabeça de “ex-biólogo”. Sou fã de vocês! Além disso, não posso deixar de agradecer também aos professores das plataformas virtuais de ensino que dispomos pela *internet*, ferramenta indispensável em tempos de isolamento domiciliar. Felizmente, o Brasil conta com grandes nomes em bioquímica na plataforma *YouTube* que faço questão de agradecer na pessoa do Prof. Dorival Filho. As aulas complementares foram tão importantes como as rodas de diálogo e estudo onde meus colegas de classe Átila, Domício, Vanessa e Bolívar me ensinavam, pacientemente, como estudar e assimilar toda informação ministrada pelos

professores, principalmente na disciplina “Fundamentos de Bioquímica e Biologia Molecular” (se aquilo era ‘fundamentos’, nem quero imaginar o que seria ‘avançado’. Risos...).

No mais, não sei, sinceramente, se caberia aqui todas as histórias que me fazem ser muito grato a cada um dos amigos que me impulsionaram nesse projeto... Para não correr o risco de ser deselegante, especialmente em relação ao nosso Núcleo de Pesquisa em Hansenologia, me limitarei apenas a agradecer aos amigos colaboradores mais diretamente atuantes no presente trabalho: Lorena, Thaisa, Taís, Dayse e Gabriel. Estendo esse agradecimentos a todos os alunos que passaram pelo núcleo. Desejo tudo de melhor para a carreira de vocês! Agradeço também ao Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais Dr. Alexandre Castelo Branco (CREDEN-PES), especialmente ao médico Alexandre em si que inesgotavelmente dava verdadeiras palestras para nos iluminar no combate à hanseníase com a mente e coração abertos, sem o menor temor às modernidades inevitáveis da carreira médica, especialmente em relação ao diagnóstico onde é consagradamente uma referência regional. Agradeço ainda à secretaria municipal de saúde de Limeira de Mantena, na pessoa da enfermeira Ângela Vinhal e de toda sua equipe que, sem sombra de dúvidas, é modelo de eficiência e organização. Gostaria de lembrar também dos meus parceiros de trajetória e do coração: Marluci, Pedro, Rafael e Tales. Já demos muitas boas risadas pelas áreas de convivência da UNIVALE, instituição que reciprocamente respeito e também presto aqui homenagem.

Por fim e não menos importantes, gostaria de agradecer aos que fomentaram essa minha trajetória. Primeiramente, à minha querida UFJF que garantiu meu direito de gozar licença para doutoramento, provendo professoras que me substituíram ao longo desses anos. Além disso, por meio do PROQUALI (Edital 01/2019), concedeu-me suporte financeiro durante parte de meu curso em terras brasileiras. Em relação às despesas referentes a coleta de dados, trabalhos de campo e rotinas de laboratório, agradeço ao Fundo Nacional de Saúde (Termo de convênio 304/2013) e à FAPEMIG (Edital 01/2015 – Demanda Universal, CBB-APQ-01379-15). Em relação à minha experiência internacional, agradeço imensamente à CAPES pela minha bolsa de estudos no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PSDE - Edital nº 41/2018 - Seleção 2019 - Processo 88881.361990/2019-01). Todos esses agradecimentos quanto aos fomentos institucionais apenas sintetizam meu profundo e incontestável agradecimento a cada contribuinte brasileiro que, por meio de seus impostos, permitiram que um simples menino “melaninado”, filho de electricista e manicure, do pequenino distrito de Rio Claro - RJ chegasse até aqui com a ajuda de Deus (1 Samuel 7:12). Eu creio que juntos somos mais fortes e vencedores, independentemente de esteriótipos. Obrigado, meu querido Brasil!

“No futuro, o pensamento estatístico será tão necessário para a cidadania eficiente como saber ler e escrever.”

Herbert George Wells

RESUMO

A hanseníase é uma doença de transmissão ativa e caracteriza-se por heterogeneidade de manifestações clínicas - do pólo tuberculóide (TT) ao virchowiano (LL) - as quais estão correlacionadas com a resposta imune mediada por células do hospedeiro contra o bacilo causador *Mycobacterium leprae*. A resposta imune do Tipo Th-1 nos pacientes com a forma clínica TT ou paucibacilar é eficaz em limitar a doença clínica. Por outro lado, a forma clínica LL ou multibacilar caracteriza-se por baixa imunidade mediada por células com uma resposta humoral pela ativação de células Th-2. O papel dos fatores genéticos do hospedeiro no desenvolvimento da hanseníase tem sido bem estabelecido através de indicadores epidemiológicos e estudos genéticos do hospedeiro na susceptibilidade à hanseníase. Os resultados de análises ampla do genoma (ligação e associação) e estudos de genes candidatos sugerem um controle genético independente tanto da susceptibilidade à hanseníase *per se* como do desenvolvimento das diferentes formas clínicas. Nesse trabalho, buscamos avaliar os níveis de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17) e quimiocinas (CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10), genotipar polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) dos genes *TLR4* (rs4986790, rs2149356, rs1927914 e rs2737190), *IL-10* (rs1554286, rs3024490, rs1800872 e rs1800871), *TLR1* (rs4833095), *TLR2* (rs3804099) e *SLC11A1* (rs17235416) de resposta imunológica dos pacientes e dos seus contatos intradomiciliares e associá-los aos dados clínicos da hanseníase. Foi também implementado um modelo baseado em *Random Forest*, que nos permitiu, com cerca de 97% de acurácia, prever a evolução clínica dos contatos domiciliares pelo reconhecimento do padrão de suas variáveis clínicas e imunológicas. Além disso, dentre outros achados, foi evidenciado um padrão diferencial das quimiocinas (em especial IL-8 e RANTES) na cultura de células estimuladas pelo *M. leprae* quando comparada a cultura sem estímulo. Foi verificada uma chance de adoecimento 2,3 vezes maior nos indivíduos portadores do alelo G nas variantes rs1927914 ou rs2737190 do gene *TLR4*.

Palavras-chave: Hanseníase. Diagnóstico. Imunologia. Genética. Inteligência artificial.

ABSTRACT

Leprosy is an active transmission disease and is characterized by heterogeneity of clinical manifestations - from the tuberculoid pole (TT) to the Virchowian (LL) - which are correlated with the host cell-mediated immune response against the causing *Mycobacterium leprae*. The Type Th-1 immune response in patients with the TT or paucibacillary form is effective in limiting the clinical disease. On the other hand, the clinical form LL or multibacillary is characterized by low cell-mediated immunity with a humoral response by the activation of Th-2 cells. The role of host genetic factors in the development of leprosy has been well established through epidemiological indicators and genetic studies of the host in susceptibility to leprosy. The results of extensive genome analyzes (linkage and association) and studies of candidate genes suggest genetic control independent of both susceptibility to leprosy *per se* and the development of different clinical forms. In this work, we seek to evaluate the levels of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , and IL-17) and chemokines (CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1, and CXCL10/IP-10), genotyping single nucleotide polymorphisms (SNP) of the *TLR4* genes (rs4986790, rs2149356, rs1927914, and rs2737190), *IL-10* (rs1554286, rs3024490, rs1800872, and rs1800871), *TLR1* (rs4833095), *TLR2* (rs3804099), and *SLC11A1* (rs17235416) of patients' response of patients and their household contacts and associate them with clinical data on leprosy. A model based on textit Random Forest was also implemented, which allowed us, with about 97% accuracy, to predict the clinical evolution of household contacts by recognizing the pattern of their clinical and immunological variables. Besides, among other findings, an differential pattern of chemokines (especially IL-8 and RANTES) was found in cell culture stimulated by *M. leprae* when compared to culture without stimulation. A 2.3 times greater chance of illness was verified in the carriers of the G allele in the rs1927914 or rs2737190 variants of the *TLR4* gene.

Key-words: Leprosy. Diagnosis. Immunology. Genetics. Artificial intelligence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Distribuição mundial da hanseníase ao longo dos anos.	21
Classificação da hanseníase, segundo <i>Ridley & Jopling</i> , onde: TT - tuberculóide tuberculóide; BT - <i>borderline</i> tuberculóide; BB - <i>borderline borderline</i> ; BL - <i>borderline</i> lepromatoso; LL - lepromatoso lepromatoso.	23
Possível rede de integração e novos paradigmas dos linfócitos T em resposta a hanseníase.	26
Sinalização de receptores do tipo <i>toll</i> e a interação com células do sistema imunológico.	29
Ilustração do processo de <i>bootstrapping</i>	43
Representação geométrica dos dados no espaço reduzido pela ACP.	44
Ilustração do processo de preparação dos dados imunológicos para modelagem por inteligência artificial.	45
Fluxograma ilustrativo dos processos inerentes ao algoritmo <i>Random Forest</i>	46
Análises de Componentes Principais nas culturas de PBMC, considerando os grupos de estudo.	55
Perfil da produção de citocinas e quimiocinas dos casos e controles em função dos genótipos dos SNPs rs4986790 (A), rs2149356 (B), rs1927914 (C) e rs2737190 (D) do gene <i>TLR4</i>	64
Perfil da produção de citocinas dos casos e controles em função dos genótipos dos SNPs rs1554286 (A), rs3024490 (B), rs1800872 (C) e rs1800871 (D) do gene <i>IL-10</i>	65
Perfil da produção de citocinas dos casos e controles em função dos genótipos dos SNPs rs4833095 (A), rs3804099 (B) e rs17235416 (C) dos genes <i>TLR1</i> , <i>TLR2</i> e <i>SLC11A1</i> , respectivamente.	66
Representação tridimensional (A) dos dados preparados para a etapa de modelagem por inteligência artificial e suas projeções nos planos bidimensionais (B).	67
Estatísticas acerca da qualidade do modelo RF.	68
Predição do risco de cada contato desenvolver sintomas da hanseníase, segundo o modelo de IA.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados dos genes e SNPs selecionados para genotipagens.	39
Tabela 2 – Caracterização da amostra em razão das variáveis demográficas qualitativas abordadas no estudo.	48
Tabela 3 – Caracterização da amostra em razão da variável quantitativa idade, em anos, complementando as informações demográficas da Tabela 2.	49
Tabela 4 – Caracterização da amostra em razão das variáveis clínicas abordadas no estudo.	50
Tabela 5 – Caracterização da amostra em razão das citocinas analisadas no presente estudo.	52
Tabela 6 – Caracterização da amostra em razão das quimiocinas analisadas no presente estudo.	53
Tabela 7 – Caracterização da amostra em razão das variáveis genéticas adotadas no estudo.	57
Tabela 8 – Avaliação das proporções dos genótipos de cada SNP analisado no presente estudo.	58
Tabela 9 – Estimativas de razão de chances considerando diferentes modelos de herança genética em relação aos SNPs rs4986790 (a), rs2149356 (b), rs1927914 (c) e rs2737190 (d) do gene <i>TLR4</i>	60
Tabela 10 – Estimativas de razão de chances considerando diferentes modelos de herança genética em relação aos SNPs rs1554286 (a), rs3024490 (b), rs1800872 (c) e rs1800871 (d) do gene <i>IL-10</i>	61
Tabela 11 – Estimativas de razão de chances considerando diferentes modelos de herança genética em relação aos SNPs rs4833095 (a), rs3804099 (b) e rs17235416 (c) respectivamente dos genes <i>TLR1</i> , <i>TLR2</i> e <i>SLCA11A1</i>	62
Tabela 12 – Árvore de decisão com erro de inferência de 3,4%.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Análise de componentes principais
BAAR	<i>Bacilos álcool-ácido resistentes</i>
BB	<i>Borderline borderline</i>
BCG	Bacilo de <i>Calmette-Guérin</i> , vacina
BL	Lepromatoso <i>borderline</i>
CBA	Ensaio de citometria com esferas
CD	Células dendríticas
CCL	Ligante de quimiocina com motivo C-C
CREDEN-PES	Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais Dr. Alexandre Castelo Branco
CXCL	Ligante de quimiocina com motivo C-X-C
DATASUS	Departamento de informática do sistema único de saúde
DNA	Ácido desoxiribonucleioco
dsRNA	Ácido ribonucleioco de fita dupla
DVDT	Departamento de vigilância de doenças transmissíveis
EDTA	Anticoagulante ácido etilendiamino tetracético
ESF	Estratégia de saúde da família
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
IA	Inteligência artificial
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IP	Proteína induzida por interferon
LL	Lepromatoso lepromatoso
LPS	Lipopolissacarídeo
MAF	Do inglês " <i>Minor Allelic Frequency</i> ", frequência da variante rara
MB	Hanseníase do tipo multibacilar
MCP	Proteína quimioatrativa de monócitos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIG	Monocina induzida por interferon gama
ML	<i>Mycobacterium leprae</i>
MSB	Ministério da Saúde do Brasil
NGF	Fator de crescimento nervoso
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PB	Hanseníase do tipo paucibacilar
PBMC	Células mononucleadas de sangue periférico
PMBqBM	Programa multicêntrico de bioquímica e biologia molecular
PBS	Salina tampão fosfato

PDSE	Programa doutorado sanduíche no exterior
PHA	Fitohemaglutinina
PQT	Poliquiomioterapia
RANTES	Células T normais expressas e segregadas, reguladas na ativação
RF	<i>Random Forest</i>
RNA	Ácido ribonucleioco
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Meio de crescimento usado em cultura de células, desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
SINAN	Sistema de informação de agravos de notificação
SLC11A1	Proteína de resistência natural associada a macrófago
SMS/GV	Secretaria municipal de saúde de Governador Valadares
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
SUS	Sistema único de saúde
TB	Tuberculóide <i>borderline</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF	Fator de crescimento transformador
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TT	Tuberculóide tuberculóide
UBS-LM	Unidade básica de saúde de Limeira de Mantena
UCSD	Universidade da Califórnia em San Diego
UFJF/GV	Universidade Federal de Juiz de Fora, <i>campus</i> Governador Valadares
VPN	Valor de predição negativa
VPP	Valor de predição positiva

LISTA DE SÍMBOLOS

\approx	Aproximadamente
\equiv	Equivalente a
$^{\circ}$	Representação de temperatura ou ângulo: <i>grau</i>
α	Letra grega minúscula <i>Alfa</i>
β	Letra grega minúscula <i>Beta</i>
γ	Letra grega minúscula <i>Gama</i>
m	Letra arábica minúscula <i>Eme</i> que representa o prefixo <i>mili</i> , equivalente a 10^{-3}
μ	Letra grega minúscula <i>Mi</i> que representa o prefixo <i>micro</i> , equivalente a 10^{-6}
η	Letra grega minúscula <i>Eta</i> que representa o prefixo <i>nano</i> , equivalente a 10^{-9}
χ	Letra grega minúscula <i>Qui</i>
k	Letra arábica minúscula <i>Ka</i> que representa o prefixo <i>kilo</i> , equivalente a 10^3
Da	Representação de unidade de massa atômica: <i>dalton</i>
g	Letra arábica minúscula <i>Gê</i> que representa uma unidade de massa: <i>grama</i>
M	Letra arábica maiúscula <i>Eme</i> que representa a quantidade de matéria do soluto por litro da solução: <i>mol</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	ASPECTOS CLÍNICOS	18
1.1.1	A hanseníase <i>per se</i>	18
1.1.2	Transmissão	18
1.1.3	Sintomas e diagnóstico	18
1.1.4	Tratamento	19
1.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	20
1.2.1	A hanseníase pelo mundo	20
1.2.2	A hanseníase no Brasil	21
1.3	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO HOSPEDEIRO NA HANSENÍASE	22
1.3.1	O <i>Mycobacterium leprae</i>	22
1.3.2	Perfis da resposta imunológica humana ao <i>M. leprae</i>	23
1.3.3	Citocinas e quimiocinas	24
1.3.4	Receptores do tipo <i>Toll</i>	28
1.4	ASPECTOS DA SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA DO HOSPEDEIRO NA HANSENÍASE	29
1.5	INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL	31
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	DEFINIÇÃO DA AMOSTRA DE ESTUDO	34
3.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	35
3.3	COLETA DE DADOS DEMOGRÁFICOS E AVALIAÇÃO CLÍNICA	36
3.4	ENSAIOS IMUNOLÓGICOS	36
3.4.1	Quantificação de citocinas e quimiocinas	37
3.5	ENSAIOS DE GENOTIPAGEM	38
3.5.1	Coleta e preparo de material biológico	38
3.5.2	Genotipagem dos SNPs selecionados	38
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
3.6.1	<i>Softwares</i> e pacotes	41
3.6.2	Tratamento dos dados	42
3.6.2.1	Valores faltantes (<i>missing values</i>)	42
3.6.2.2	<i>Imputação</i>	42
3.6.2.3	<i>Bootstrapping</i>	42
3.6.2.4	<i>Análise de Componentes Principais</i>	44
3.6.3	Modelagem <i>via</i> Inteligência artificial	46

4	RESULTADOS	48
4.1	ASPECTOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS	48
4.2	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS	51
4.3	ASPECTOS MOLECULARES	57
4.3.1	Imunogenética	63
4.4	ALGORITMO DA SUSCETIBILIDADE E EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS CONTATOS INTRADOMICILIARES	67
5	DISCUSSÃO	72
5.1	ASPECTOS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICOS E MOLECULARES	72
5.2	A TECNOLOGIA DE IA COMO FORMA DE INCLUSÃO, ACESSIBILIDADE E COMBATE À HANSENÍASE	76
5.3	ACOMPANHAMENTO DOS CONTATOS	77
5.4	NATUREZA DA AMOSTRA, QUALIDADE DOS DADOS, PLASTICIDADE DAS ANÁLISES E SOLUÇÕES PROPOSTAS	78
6	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXO A – Questionário clínico e sócio-demográfico aplicado aos pacientes do projeto.	93
	ANEXO B – Parecer consubstanciado no Comitê de Ética em Pes- quisa da UFJF.	98
	ANEXO C – Termos de consentimento e assentimento livre e escla- recido aplicados na pesquisa.	104
	ANEXO D – Vias de sinalização de alguns TLRs.	114
	ANEXO E – Carta de concessão do PDSE da CAPES.	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS CLÍNICOS

1.1.1 A hanseníase *per se*

A hanseníase é uma doença bacteriana infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. O termo hanseníase homenageia Gerhard Henrick Armauer Hansen, médico bacteriologista e dermatologista norueguês que identificou o patógeno em 1873. Trata-se de uma bacteriose que possui registros milenares retratados inclusive na Bíblia (1) pelo termo “lepra” que, ao longo dos anos, vem sendo abolido por seu caráter estigmatizante que dificulta a compreensão e o tratamento da doença (2).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença afeta principalmente a pele, os nervos periféricos, as superfícies mucosas do trato respiratório superior e os olhos. Ocorre em qualquer idade, gênero e etnia, possui cura e seu tratamento precoce reduz as chances de sequelas e deformidades (3).

1.1.2 Transmissão

O mecanismo exato de transmissão da hanseníase ainda não é conhecido, mas atualmente difunde-se que a doença seja transmitida pelo contato prolongado entre doentes e pessoas saudáveis. A hipótese da transmissão pela via respiratória, via gotículas de saliva expelidas por pessoas contaminadas pelo bacilo, vem sendo bastante amadurecida e aceita, embora existam outras hipóteses como a da transmissão através de insetos (4) e pelo consumo de carne de tatu (5), animal considerado reservatório natural do *M. leprae*, fato que deu margem para que a hanseníase seja tratada como zoonose nos EUA (6).

1.1.3 Sintomas e diagnóstico

Tratando-se de uma dermatoneuropatologia, o diagnóstico da hanseníase baseia-se na análise simultânea de certas características da pele e dos nervos do paciente. A OMS sugere que, nas áreas com alta incidência, um indivíduo seja considerado portador da doença ao apresentar lesões e/ou manchas cutâneas com perda sensitiva definida, independentemente do espessamento neural (7).

A avaliação dermatológica visa identificar as lesões de pele próprias da hanseníase, pesquisando a sensibilidade nas mesmas. As lesões cutâneas podem ser únicas ou múltiplas, geralmente menos pigmentadas do que a pele normal circundante. A presença de máculas (planas), pápulas (levantadas) e/ou nódulos são comuns, mas a perda sensorial também é uma manifestação típica da hanseníase. Nervos periféricos espessados costumam caracterizar a doença, apesar de não ser um sinal definitivo, principalmente na ausência de perda sensorial e/ou fraqueza muscular (8).

Deve ser feita uma inspeção de toda a superfície corporal, no sentido crânio-caudal, seguimento por seguimento, procurando identificar as áreas acometidas por lesões de pele. As áreas onde as lesões ocorrem com maior frequência são: face, orelhas, nádegas, braços, pernas e costas, mas elas podem ocorrer, também, na mucosa nasal. Devem ser realizadas as seguintes pesquisas de sensibilidade nas lesões de pele: térmica, dolorosa, e tátil, que se complementam. Considera-se como caso de hanseníase a pessoa que apresenta uma ou mais lesões de pele com alteração de sensibilidade, e/ou acometimento de pelo menos um nervo com espessamento neural, e/ou baciloscopia positiva (9).

Embora existam outras metodologias para a classificação da hanseníase, considerando aspectos imunológicos que serão descritos mais adiante nesse trabalho, a OMS, para fins operacionais em prol da eliminação da doença como um problema de saúde pública, estabelece um diagnóstico com base nas manifestações clínicas e nos resultados da baciloscopia que é um exame microscópico para verificar a presença de bacilos de *Hansen*. Nesse exame, o agente etiológico é devidamente corado em lâminas preparadas a partir de raspado intradérmico coletados dos lóbulos auriculares, cotovelos e lesões típicas da doença (nódulos, tubérculos e placas eritematosas) (10, 11).

Na classificação baseada em baciloscopia, conhecida como operacional, pacientes apresentando esfregaços negativos em todos os locais são considerados portadores de hanseníase paucibacilar (PB), enquanto aqueles apresentando esfregaços positivos em qualquer um dos locais são portadores de hanseníase multibacilar (MB). Contudo, considerando o tamanho da amostra do presente estudo, não consideraremos esse grau de distinção entre os indivíduos doentes em nossas análises. Focaremos no estudo de indivíduos diagnosticados com hanseníase e indivíduos controles, conforme será descrito na seção voltada à metodologia aplicada nesse trabalho.

1.1.4 Tratamento

A hanseníase é curável mediante a combinação de três medicamentos (rifampicina, dapsona e clofazimina) conhecida como poliquimioterapia (PQT), uma vez que o tratamento com apenas uma droga antilepróica (monoterapia) poderia contribuir para a seleção de cepas resistentes. A combinação de drogas usadas na PQT dependia da classificação da doença, mas a rifampicina, medicamento bactericida mais importante contra o *M. leprae*, era sempre incluído no tratamento de ambos os tipos de hanseníase (12). Atualmente, tanto para o tratamento de pacientes MB (de maior carga bacilar) como para os PB (de menor carga bacilar), a OMS recomenda uma combinação de rifampicina, clofazimina e dapsona em um período de até 12 meses. Após as primeiras doses dessas medicações, o indivíduo já não transmite mais a doença, porém, é necessário concluir o tratamento para que ocorra a cura completa e sejam evitadas reincidências e novas contaminações (13).

Em uma pequena quantidade de pacientes, entretanto, a hanseníase se torna resistente à rifampicina. Para esses casos, o Ministério de Saúde do Brasil (MSB) em suas Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, preconiza a troca da rifampicina por minociclina ou ofloxacino, substância que também pode provocar resistência. Os pacientes resistentes a esses medicamentos passaram recentemente a contar também com o antibiótico Claritromicina no rol de medicamentos para tratamento da hanseníase pelo SUS.

Alguns autores afirmam que a clofazimina tem baixa absorção quando administrada por via oral devido à sua baixa solubilidade em água, contribuindo para a redução da biodisponibilidade, limitando a sua aplicação. Contudo, foi observado, recentemente, a utilização de um novo sal de clofazimina com ácido 4-aminobenzóico a fim de aumentar essa biodisponibilidade (12). Assim, percebemos a importância de um tratamento adequado, derivado de um diagnóstico preciso, para a promoção da eficiência do sistema público de saúde e para controlar o surgimento de cepas resistentes do *M. leprae*.

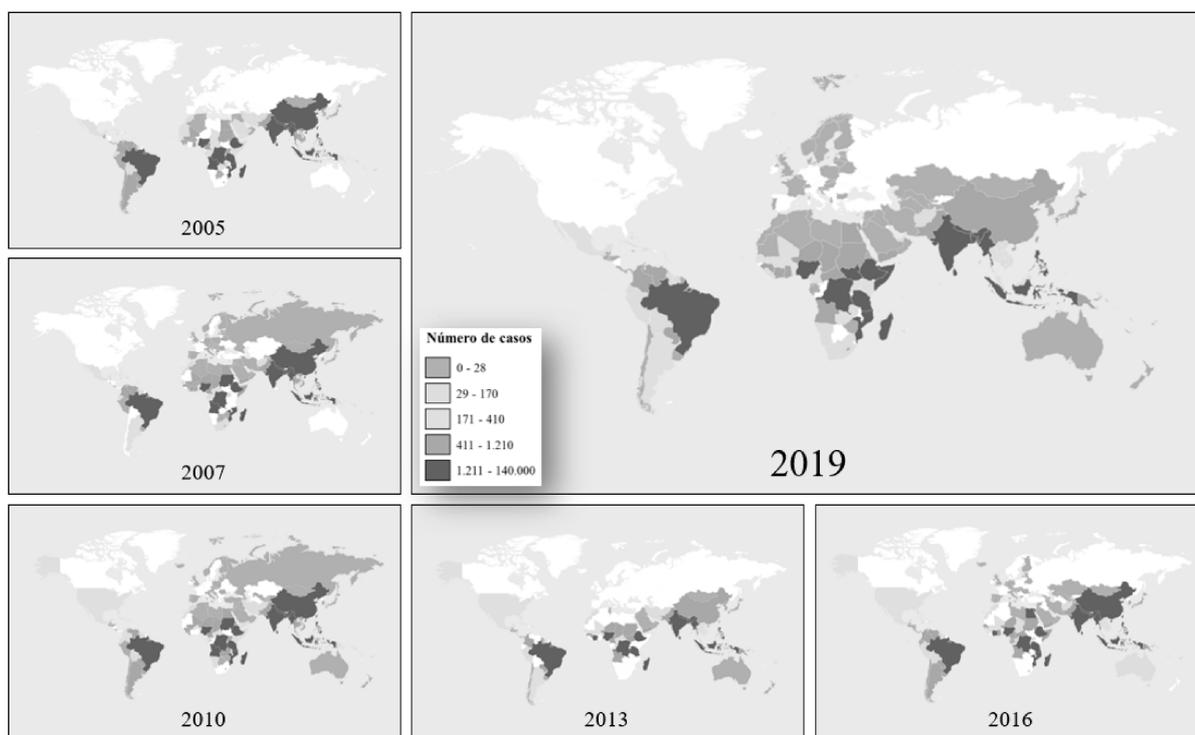
1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

1.2.1 A hanseníase pelo mundo

Trata-se de uma doença infecciosa crônica que apesar de ainda afetar centenas de milhares de pessoas anualmente ao redor do mundo, já apresentou prevalência na ordem de milhões de casos até a década de 80 (10). Essa drástica redução de casos nos últimos 30 anos se deve à adoção da PQT, embora, desde a última década, a incidência dessa doença permanece consistente, indicando uma continuidade na transmissão (14). Os países com o maior número de casos novos são a Índia, Brasil e Indonésia, seguidos por algumas nações africanas. Mais da metade de todos os novos casos de hanseníase são diagnosticados na Índia, que continua sendo o lar de um terço dos pobres do mundo (7). A Figura 1 apresenta um panorama da distribuição mundial da hanseníase nos anos 2005, 2007, 2010, 2013, 2016 e 2019.

O número de casos novos em crianças menores de 15 anos e o número de pacientes com deformidade ou deficiência visível nas mãos ou nos pés (grau de incapacidade “Nível 2”) relatados todos os anos são bons indicadores da transmissão em curso e do atraso na detecção de casos, respectivamente. Tal contexto é resultado da carência de métodos de diagnóstico precoce, bem como da limitada consciência e conhecimento dos sinais e sintomas da doença entre o público e os profissionais de saúde (15). Nesse cenário, a hanseníase vem sendo classificada pela comunidade científica como uma doença negligenciada carente de maiores intervenções (16), fato inclusive endossado pela OMS que, por sua vez, vem sendo obrigada a adiar, ao longo dos anos, suas metas para eliminação dessa doença como um problema de saúde pública (17).

Figura 1 – Distribuição mundial da hanseníase ao longo dos anos.



Fonte: Adaptado de

<https://knoema.com/atlas/topics/Health/Communicable-Diseases/Leprosy-cases?type=maps>.

1.2.2 A hanseníase no Brasil

Segundo o sítio *knoema.com* (fonte da Figura 1), o Brasil, em valores absolutos, perde apenas para a Índia em número de casos novos de hanseníase por ano. Contudo, se considerarmos o tamanho das respectivas populações, nosso país fica em primeiro lugar em termos relativos, uma vez que a Índia é cerca de seis vezes mais populosa que o Brasil (18).

A existência de *clusters* de casos novos de hanseníase envolvendo diferentes estados do Brasil revela a manutenção de elevada carga da doença em áreas delimitadas (19). Em 2017, o Brasil apresentou aproximadamente 13 casos a cada 100 mil habitantes, permanecendo com *status* de alta endemicidade, destacando-se as regiões Centro-oeste, Norte e Nordeste (20). Encontramos na literatura inferência de que muitas comunidades têm ainda permanecido sob o risco dessa patologia milenar da qual derivam mazelas como deformidades, incapacitações e estigmas (21). Os arredores da cidade brasileira de Governador Valadares, ao leste do estado de Minas Gerais, onde foi realizado o presente trabalho, é considerada área hiperendêmica pertencendo a um dos grandes focos nacionais da doença (22).

A OMS define, como estratégia principal para o controle da hanseníase, o diagnóstico precoce associado ao tratamento oportuno de todos os casos. Nesse sentido, ações de vigilância devem ser priorizadas em áreas específicas do território nacional, ocorrendo de forma contínua e sistemática (7). Entendia-se como contato domiciliar qualquer pessoa que residisse ou tivesse residido com um caso novo de hanseníase no âmbito do domicílio nos últimos cinco anos anteriores ao diagnóstico da doença (23). Porém, ao verificar maior risco associado também a contatos fora do espaço domiciliar, o MSB passou a incorporar, em suas diretrizes, a ampliação das ações de vigilância para essa população. Assim, definiu-se contato social como qualquer pessoa que conviva, ou tenha convivido, de forma próxima e prolongada com um caso não tratado.

A hanseníase detém *status* de doença negligenciada e, a despeito das falhas nos serviços de saúde que ampliam a vulnerabilidade à manutenção da doença, fatores como acesso limitado a informação, baixa renda e condições precárias de moradia atuam fortemente na persistência dessa endemia brasileira (24). Alcançar novas perspectivas, tanto no diagnóstico quanto no tratamento, promove a otimização operacional das equipes de saúde da família (25) que, nas devidas proporções, podem contribuir, a passos largos, para a erradicação dessa doença milenar que assola a humanidade.

1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO HOSPEDEIRO NA HANSENÍASE

1.3.1 O *Mycobacterium leprae*

Trata-se de uma actinobactéria com crescimento extremamente lento em relação aos demais espécimes do reino monera. Medindo cerca de $0,4\mu m$ de diâmetro e $5,0\mu m$ de comprimento, vive melhor em temperaturas em torno de $30^{\circ}C$, provável motivo pelo qual infectam as extremidades do corpo (26). É um microrganismo de incubação lenta (de 2 à 7 anos) e baixa patogenicidade, responsável por uma infecção crônica em humanos que afeta principalmente os nervos periféricos e a pele. Interage com o metabolismo lipídico da célula hospedeira e seus fatores de virulência o protegem de formas tóxicas de oxigênio a fim de promover a sobrevivência intracelular bacteriana (27).

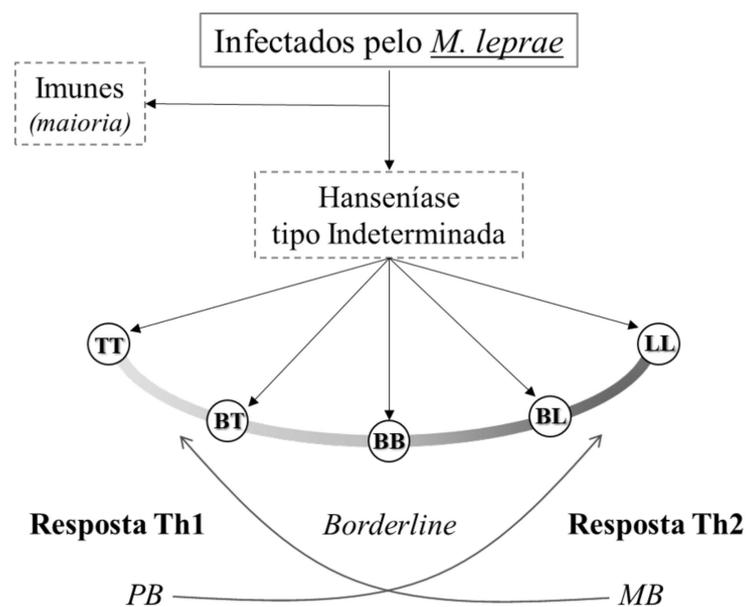
Na pele, tem afinidade por queratinócitos, macrófagos e histiócitos enquanto que nos nervos periféricos pode ser encontrado nas células de *Schwann* (28). A predileção pela célula de *Schwann* inicia-se após sua ligação à $\alpha 2$ -laminina e às adesinas localizadas na lâmina basal e aos receptores α -dístroglicana e ErbB2 em sua superfície celular (29). A entrada do patógeno nas células de *Schwann* faz com que as células se desdiferenciem em células imaturas através da ativação da sinalização da via Erk1/2, criando um ambiente favorável à sua proliferação (30). Essa desdiferenciação pode conduzir a célula de *Schwann* à uma célula com uma infinidade de novas capacidades, assim como as células-tronco. A rediferenciação em células mesenquimais confere a capacidade de disseminar infecção ou induzir macrófagos a se desenvolverem (31).

1.3.2 Perfis da resposta imunológica humana ao *M. leprae*

De uma forma geral, a espécie humana apresenta resistência natural ao bacilo de Hansen, ao passo que apenas cerca de 5% dos indivíduos expostos ao agente etiológico adoecem (32). Ainda assim, dentre os que adoecem, existem diferentes formas de manifestação da doença, em função do perfil imunogenético do hospedeiro, desde a forma mais branda até a forma mais grave que é historicamente reconhecida e estigmatizada pelas terríveis sequelas e mutilações.

A enfermidade derivada da infecção pelo *M. leprae* apresenta distribuição espectral caracterizada na classificação de *Ridley & Jopling* (33), bastante utilizada em estudos acadêmicos por basear-se no critério histopatológico e sugerir que as formas clínicas oscilem entre pólo de resistência (TT) e o pólo de susceptibilidade (LL), conforme a Figura 2.

Figura 2 – Classificação da hanseníase, segundo *Ridley & Jopling*, onde: TT - tuberculóide tuberculóide; BT - *borderline* tuberculóide; BB - *borderline borderline*; BL - *borderline* lepromatoso; LL - lepromatoso lepromatoso.



Fonte: Adaptado de Neder e colaboradores, em 2014 (34).

A classificação de *Ridley & Jopling* depende do teste de *Mitsuda* (35) em que injeta-se 0,1 mL do antígeno do *M. leprae* na face ventral do antebraço e após 21 dias realiza-se a interpretação visual da reação cutânea devido a resposta imune do paciente. Assim, é possível saber se o paciente tem a forma clínica tuberculóide ou *virchowiana* em função de sua reação dermatológica ao antígeno.

O teste de *Mitsuda* é positivo nos pacientes com vigorosa resposta celular, poucos bacilos e lesões limitadas, ao passo que é negativo nos pacientes com lesões de pele difusamente distribuídas e que apresentam uma potente resposta humoral. Nessa doença espectral, a imunidade mediada por célula tem caráter protetivo pois 90% dos adultos são *Mitsuda* positivos (36). Em função da dificuldade de conseguir o material biológico necessário para o teste de *Mitsuda*, este se torna impraticável em muitas regiões do país, gerando assim uma demanda por outros métodos de classificação da doença. No Brasil, a classificação de *Madri* também é adotada a fim de distinguir pacientes doentes entre tuberculóides, indeterminados, dimorfos ou *virchowianos* (37).

Além disso, como já mencionado anteriormente, a OMS (38) recomenda uma classificação operacional que dicotomiza os pacientes em PB ou MB de acordo com a quantidade de lesões cutâneas (manifestações clínicas), de forma que pacientes com mais de cinco lesões sejam classificados como MB e os demais, PB. Embora a OMS oriente essa classificação binária e prática, buscando alcançar maior cobertura do tratamento, a hanseníase continua sendo uma doença de respostas imunes celular e humoral, paradoxais, dinâmicas, com variações espontâneas de reatividade com o passar do tempo e conforme o tratamento, caracterizando as reações hansênicas agudas, tipo 1 e tipo 2 (36).

1.3.3 Citocinas e quimiocinas

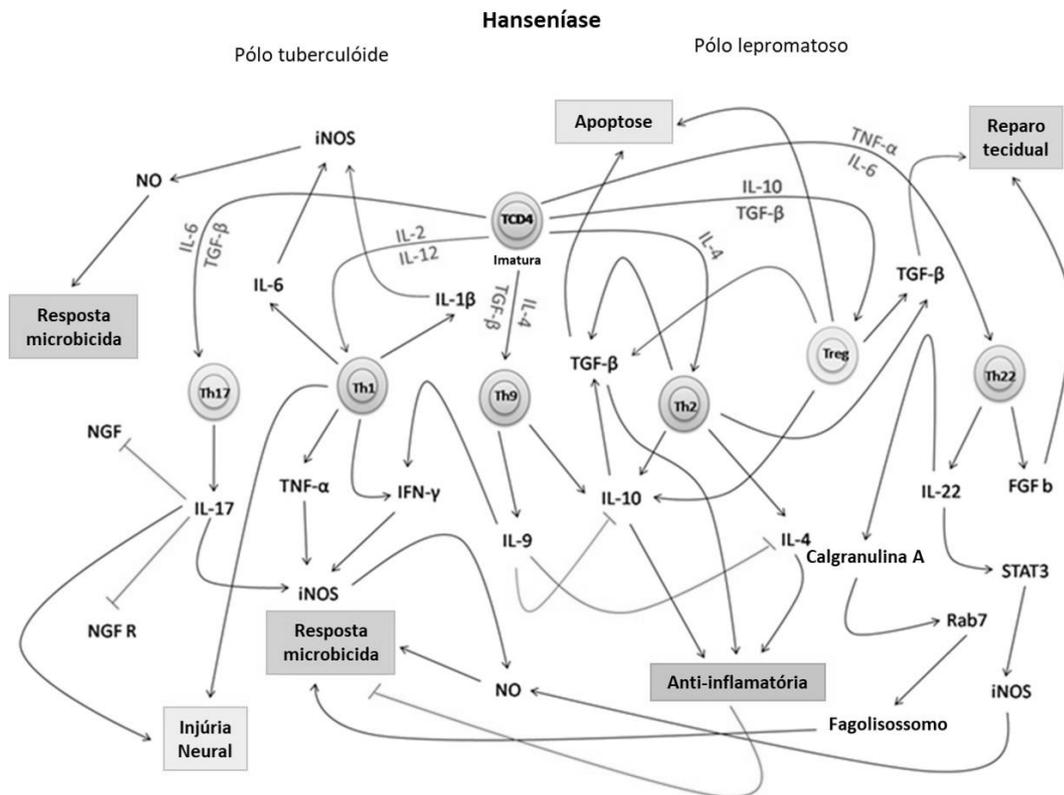
As citocinas formam uma ampla categoria de pequenas proteínas (≈ 5 a 20 kDa) que são importantes na sinalização celular. Esses peptídeos estão envolvidos na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes, constituindo um grupo de fatores extra-celulares que podem ser produzidos, dentre outras células, por monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos. As citocinas podem ainda interagir entre si, aumentando ou diminuindo a ação uma das outras em um complexo sistema não-linear de interdependência (39).

Esse conjunto de proteínas sinalizadores incluem quimiocinas, interferons, interleucinas, linfocinas, fator de necrose tumoral, mas geralmente não incluem hormônios ou fatores de crescimento (40). As quimiocinas, especificamente, formam uma família de peptídeos geralmente ainda menores (≈ 8 a 10 kDa) secretados pelas células com a capacidade de induzir quimiotaxia direcionada a células responsivas próximas, por gradiente de concentração. Apresentam geralmente quatro resíduos de cisteína em locais conservados, essenciais para compor sua forma tridimensional (41).

A influência da hanseníase na resposta imunológica do hospedeiro vem sendo objeto de estudo há algumas décadas, inclusive por meio da quantificação de citocinas e quimiocinas (42, 43). A gravidade e a evolução da hanseníase são caracterizadas por aspectos genéticos, imunológicos e ambientais que determinam a suscetibilidade do indivíduo à doença (44) que se manifesta em uma pequena parcela da população mundial, seja de forma mais branda ou de forma mais grave na qual observa-se uma alta concentração de bacilos. Os indivíduos nesse pólo mais grave são chamados de multibacilares (45) e tipicamente desenvolvem uma resposta celular bastante fraca, incapaz de conter a proliferação do *M. leprae*. Por outro lado, esses indivíduos costumam apresentar uma intensa resposta humoral e altos títulos de anticorpos séricos específicos contra o bacilo (46). A suscetibilidade também é influenciada por fatores hereditários, com diferentes expressões de genes envolvidos na resposta imune humoral e de genes para receptores de imunoglobulinas ou proteínas da via clássica do complemento (47).

Os eventos de defesa do hospedeiro prontamente ativados na infecção, durante a fase “indeterminada” da doença, são talvez os aspectos menos compreendidos da imunologia da hanseníase. Uma resposta imune inata eficaz em combinação com a baixa virulência do *M. leprae* pode ser a base da resistência do hospedeiro frente a esse agente infeccioso. Na ausência de uma resposta imune adaptativa, as células dendríticas (CD), que são fundamentais na modulação da resposta imune inata precoce ao *M. leprae*, podem ser as primeiras células a encontrar os bacilos no local da invasão (*e.g.* mucosa nasal ou abrasão da pele). A captação de micobactérias pelas CD e a consequente produção local de citocinas e quimiocinas regulam a inflamação e são conhecidos por influenciar o curso da imunidade adaptativa mediada por células em uma resposta Th1, Th2, Th17 e outras contra *M. leprae*. A resposta imunológica humana a esse bacilo recebe atenção até os dias atuais (48, 49), apesar de percebermos poucos desdobramentos em imunogenética da maneira que abordamos no presente trabalho. A Figura 3 demonstra a maneira multivariada e não linear de correlação existente entre algumas citocinas.

Figura 3 – Possível rede de integração e novos paradigmas dos linfócitos T em resposta a hanseníase.



Fonte: Adaptado do trabalho de Sousa e colaboradores, em 2017 (50).

Devido à complexidade da resposta imune, nas formas polares da hanseníase, os linfócitos T CD4 imaturos, sob a influência de várias citocinas (denotadas em vermelho na Figura 3), podem se diferenciar em várias subpopulações T, como: T *helper* (Th) 1, Th2, Th9, Th17, Th22, e Treg. Essa rede de conexões contribui para fortalecer a hipótese do presente trabalho em relação à busca de biomarcadores baseada na mensuração conjunta da produção de proteínas do sistema imunológico quando estimulado por *M. leprae*. Essa hipótese, gerada por ensaios *in vitro*, será demonstrada e discutida mais adiante no presente estudo.

Segundo os autores da Figura 3 (50), na forma tuberculóide, os linfócitos Th1, Th9 e Th17 participam diretamente da resposta pró-inflamatória, induzindo a produção de citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-17, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ), induzindo também a atividade microbicida de macrófagos. Devido à intensidade do processo inflamatório, a IL-17 regula negativamente a produção do fator de crescimento do nervo (NGF) e seu respectivo receptor (NGFR), potencializando o dano neural junto com a resposta dos linfócitos Th1. Na forma *virchowiana*, os linfócitos Th2 e Treg participam da resposta anti-inflamatória produzindo as citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β que inibem a ativação de macrófagos, facilitando a sobrevivência do *M. leprae*.

Na resposta Th9, a IL-9 regula negativamente a produção de IL-4 e IL-10. Na forma clínica *virchowiana*, em que o número de lesões é muito superior ao da forma tuberculóide, a atuação de fatores de crescimento, como o TGF- β e o fator de crescimento básico de fibroblastos (FGF b), é fundamental para induzir a reparação tecidual. Considerando a resposta dos linfócitos Th22, novas abordagens têm mostrado que, nos macrófagos infectados pelo bacilo, a IL-22 regula positivamente a produção de calgranulina A e STAT3. Isso interfere não só no processo de maturação do fagolisossomo pela expressão de Rab7, mas também na resposta microbicida de macrófagos onde STAT3 induz a produção de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), e conseqüentemente NO, que destrói *M. leprae* (50).

Embora as DC sejam conhecidas por serem apresentadoras eficazes do antígeno desse bacilo, as DC derivadas de monócitos infectadas por *M. leprae* são caracterizadas por uma diminuição significativa na expressão dos complexos principais de histocompatibilidade (MHC) classes I e II. Por outro lado, as DC estimuladas com antígenos de membrana do *M. leprae* aumentam a expressão do MHC de classe II e a produção de interleucina-12 associada ao ligante CD40 (IL12) (51), sugerindo que bacilos vivos inteiros podem suprimir a interação entre as células T e DC.

As células de *Langerhans*, um subconjunto das DC, são conhecidas por iniciar respostas imunológicas na pele. Pacientes com hanseníase *virchowiana* (LL) têm significativamente menos células de *Langerhans*, tanto na lesão quanto na pele saudável, quando comparados com controles não infectados ou pacientes com hanseníase tuberculóide (TT). Em contraste, pacientes com lesões de TT aumentaram a frequência de células de *Langerhans* nas lesões, sugerindo que ocorre infiltração ativa dessas células nesses locais. As citocinas produzidas dentro da lesão sugerem a existência de uma correlação com os receptores do tipo *Toll* (TLR): as citocinas do tipo Th1 foram geralmente associadas à ativação de TLR1 e TLR2, e as citocinas do tipo Th2 foram associadas à inibição da ativação. A expressão de TLR1 e TLR2 é mais forte em monócitos e DC em lesões de TT do que em contrapartes LL. Estudos in vitro mostraram que as lipoproteínas de 19 e 33 kDa do *M. leprae* podem ativar monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos por meio de TLR2 (52).

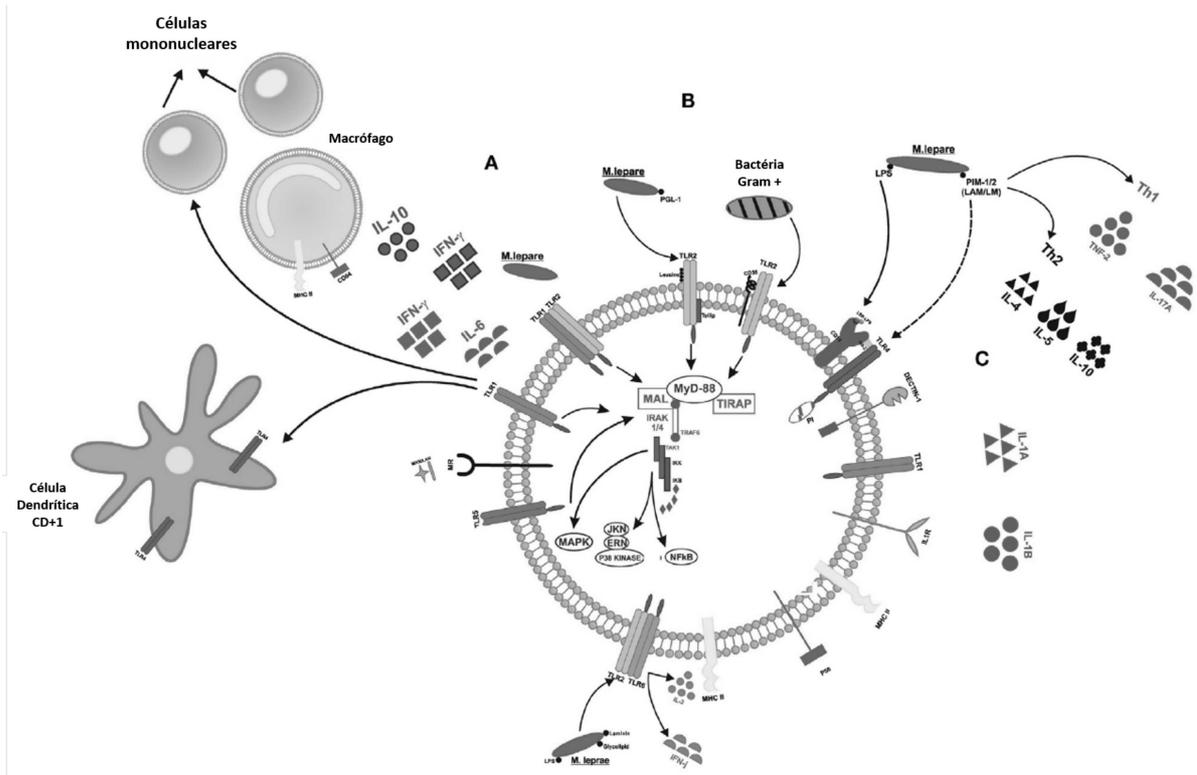
1.3.4 Receptores do tipo *Toll*

Identificados pela sigla TLR (do inglês *toll-like receptors*), integram uma família de proteínas transmembranas do tipo I que formam uma parte do sistema imunológico inato e também do adaptativo (nos vertebrados). São responsáveis pelo reconhecimento de vários padrões moleculares associados a patógenos, PAMPs (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*), expressados por um amplo espectro de agentes infecciosos que ao romperem as barreiras físicas do corpo, ativam as respostas das células imunes. Dessa forma, monócitos, macrófagos e neutrófilos fagocitam esses patógenos microbianos, estimulando a produção de citocinas relacionadas à imunidade inata e à resposta inflamatória, sem deixar de mediar a efetiva imunidade adaptativa (53).

Estudos demonstram que os TLRs ativam a via de NFkB regulando a expressão de citocinas através de diversas moléculas como MyD88, TIRAP/Mai e TRF (vide Anexo D). Essa ativação conduz a iniciação da resposta imune adaptativa pela produção de citocinas inflamatórias tais como a IL-1, IL-8, TNF- α , IL-12, e a indução de moléculas de co-estimulação, tais como a CD80, CD86 e CD40 (54, 55). Existem relações bem estabelecidas quanto aos TLRs e seus respectivos antígenos de reconhecimento, como por exemplo: TLR1, associado a lipopeptídeos bacterianos; TLR2, a peptídeoglicanos; TLR3, a dsRNA; e TLR4 que reconhece lipopolissacarídeos e ácido lipoteicoico (56). Diante disso, considerando as características peculiares do *M. leprae*, é importante considerar a atuação dos TLRs na modulação do sistema imune frente a hanseníase, como disposto na literatura (52, 57), a fim de verificar ou confirmar possíveis vias de suscetibilidade a essa endemia nacional.

Na Figura 4 podemos visualizar a intrínseca relação entre receptores do tipo *toll* e a resposta imunológica frente ao *M. leprae*: (A) TLR1 atua na diferenciação de células mononucleares em macrófagos, liberando citocinas, como IFN- γ e IL-6. Os macrófagos ativados podem liberar IFN- γ e IL-12. Este receptor também opera na maturação de células dendríticas, que se tornam capazes de apresentar o peptídeo aos linfócitos T; (B) Heterodímero TLR2 com outros marcadores, como TLR1, TLR6, CD36, *Dectina1*, sendo capaz de reconhecer os componentes da membrana das bactérias *Gram*⁺ e *Gram*⁻; (C) TLR4 forma um complexo com MD2 em resposta a um lipolissacarídeo (LPS) que se liga ao marcador CD14 dando sequência a reações que culminam na sinalização intracelular (58).

Figura 4 – Sinalização de receptores do tipo *toll* e a interação com células do sistema imunológico.



Fonte: Adaptada do trabalho de Mazini e colaboradores, em 2016 (58).

1.4 ASPECTOS DA SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA DO HOSPEDEIRO NA HANSENÍASE

Acredita-se que os fatores genéticos do hospedeiro influenciam a susceptibilidade à infecção, bem como a progressão de uma doença. Estudos de associação ampla do genoma (GWAS) têm sido realizados com o propósito de identificar e validar estes fatores genéticos de risco em várias etnias/grupos populacionais (59). Estudos de genética epidemiológica têm como base o fato de que, dependendo da frequência de determinado genótipo de susceptibilidade em uma população exposta ao agente etiológico, essa informação pode ser considerada útil para justificar a implantação de medidas de prevenção da doença no local, a fim de evitar o surgimento de novos casos (60).

A influência do componente genético do hospedeiro no risco de desenvolver as formas da hanseníase, ou na proteção dessa doença, foi amplamente demonstrada através de diferentes estratégias, como por exemplo, estudos de segregação e estudos de gêmeos (61). Trabalhos como este demonstraram uma frequência aumentada de pacientes em famílias com casamentos consanguíneos, além de uma maior concordância entre gêmeos monozigóticos em relação aos dizigóticos no que diz respeito à incidência da doença. Outros estudos demonstram que a frequência das diferentes formas clínicas não é aleatória em

parentes afetados e também detectaram diferentes taxas de prevalência da doença em grupos étnicos distintos vivendo em uma mesma área endêmica (62).

O desenvolvimento de estudos de associação e ligação possibilitou, até o presente momento, a identificação de variantes em genes tais como o TNF, LTA, HLADRB1, IL-10, VDR e PARK2/PACRG (63, 64) ainda que poucos tenham sido replicados em populações distintas. Os estudos com o gene da linfotóxina- α (LTA) suscitaram um novo questionamento a respeito da influência dos polimorfismos genéticos no desenvolvimento da hanseníase (65). Muitos locos e suas variantes associados com suscetibilidade ou proteção à hanseníase em estudos de associação ampla do genoma estão compilados em um banco de dados do ENSEMBL disponível livremente *online* (66). Entretanto, tais *locos* representam apenas parte do componente genético envolvido na doença (herdabilidade), indicativo que ainda há outros genes que precisam ser identificados (67).

A maioria das investigações envolvendo análises do genoma para identificar polimorfismos de suscetibilidade de risco no desenvolvimento clínico da hanseníase não associa outras variáveis fenotípicas como dados clínicos e de resposta imunológica para criar um modelo de algoritmo prognóstico que permitiria traçar intervenções terapêuticas e preventivas eficientes (63, 68). No caso específico da hanseníase, em que o agente etiológico passa diretamente de uma pessoa para a outra, estratégias de predição de susceptibilidade seriam de fundamental importância, uma vez que não há como evitar a transmissão ativa da doença enquanto os indivíduos permanecem assintomáticos. A identificação de marcadores genéticos teria grande utilidade no rastreamento de indivíduos mais suscetíveis, além de melhorar a qualidade de vida dos doentes evitando complicações clínicas, incapacidades e estigmas derivados de tratamentos equivocados (69).

Nesse contexto, destacamos os estudos de polimorfismo de nucleotídeos únicos, conhecidos e muito abordados na literatura como SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism* (70). Um SNP é uma variação na sequência de DNA que afeta somente uma base nitrogenada na sequência do genoma entre indivíduos de uma espécie ou entre pares de cromossomos de um indivíduo (71), ocorrendo, no mínimo, em 1% da população. Também são considerados SNPs a troca de poucos nucleotídeos, assim como pequenas inserções ou deleções de bases nitrogenadas (72). Os SNPs são marcadores estáveis, com alta frequência (cerca de um a cada 1.300 bases) e de fácil automatização (73), constituindo cerca de 90% de todas as variações genômicas humanas. Esses marcadores apresentam baixa taxa de mutação, sendo úteis nos estudos genéticos associados a doenças humanas e na farmacogenética (71).

SNPs em genes relacionados ao sistema imunológico do hospedeiro têm sido sugeridos consistentemente para o estudo da suscetibilidade à hanseníase (74). A variante rs1800871 do gene IL-10 foi testada em vários estudos de caso-controle indicando associação com risco da doença, embora não haja um consenso. O alelo A da variante rs1800872 também parece estar associado à hanseníase, embora outros SNPs do gene IL-10 careçam de evidências nessa enfermidade (75).

A resposta imune dos indivíduos frente à hanseníase aparenta se relacionar com SNPs nos receptores do tipo Toll, uma vez que foram observadas diferenças nos níveis séricos de algumas citocinas e quimiocinas em relação aos polimorfismos TLR1. Para o SNP rs4833095, foram encontradas diferenças significativas nos níveis de IL-12 e IL-17, em que os pacientes portadores do alelo T produziram maiores quantidades dessas duas citocinas em comparação com indivíduos homozigotos para o genótipo CC. Além disso, foram encontradas evidências de que os portadores do genótipo TT produziam níveis séricos mais baixos de quimiocina MCP-1 que os demais. Quanto ao TLR2, indivíduos portadores do alelo T parecem produzir mais níveis séricos de IL-17 na variante rs3804099. Já para o marcador rs1927914 do gene TLR4, portadores do alelo A parecem apresentar maiores níveis séricos de IL-17 e IL-1 β que os demais (76). Contudo, no geral, estudos associando variantes genéticas e perfis imunológicos são escassos e poderiam ser úteis no entendimento dos mecanismos moleculares na patogênese da hanseníase (77).

1.5 INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Dentre as tecnologias de informação, inteligência artificial (IA) é aquela demonstrada por máquinas, em contraste com a inteligência natural dos seres humanos. Em termos gerais, IA é um conjunto de algoritmos estruturados que imitam funções “cognitivas” outrora exclusivamente associadas à mente humana, como “aprendizado” e “solução de problemas” (78).

Com o advento da computação e seu crescimento exponencial em termos de software e hardware, e também em função da acessibilidade a essas tecnologias, tarefas outrora consideradas como “inteligência” vem sendo frequentemente removidas da definição de IA, um fenômeno conhecido como efeito da IA (79). Ou seja, a partir do momento que tarefas humanamente complexas sejam realizadas fácil e corriqueiramente pelas máquinas, essas deixam de compor o amplo espectro do aprendizado de máquina tornando-se ferramentas computacionais comuns da existência humana.

A IA pode ser classificada como: *i.* analítica, que possui apenas características consistentes com a inteligência cognitiva via experiências passadas para tomar decisões futuras; *ii.* inspirada em humanos, que tem elementos da inteligência cognitiva e emocional para tomada de decisões; *iii.* humanizada, que demonstra características cognitivas, emocionais e sociais sendo capaz de ser autoconsciente nas interações (80).

Ao contrário do possível imaginário popular, essa área da ciência já existe há mais de meio século uma vez que fora iniciada, como conteúdo acadêmico, em 1956. A partir daí, experimentou momentos de otimismo, mas também momentos de decepção e perda de financiamento (conhecido como “inverno IA”) que suscitaram novas abordagens que por sua vez obtiveram sucesso e financiamento renovado (79). Os campos tradicionais da pesquisa em aprendizado de máquina incluem raciocínio, representação do conhecimento, planejamento, aprendizado, processamento de linguagem natural, percepção e a capacidade de mover e manipular objetos. É uma frente de pesquisa que baseia-se em ciência da computação, engenharia da informação, matemática, estatística, psicologia, linguística, direito, ética, filosofia entre outros campos (78).

Dado o crescente volume e velocidade de acesso à informação que experimentamos dia após dia, fenômeno conhecido como *Big Data* (81), a IA tem se demonstrado cada vez mais importante, demandando uma gama de algoritmos a fim de alcançar os mais diversos objetivos, como: algoritmos de aprendizado supervisionado, que geram uma função que mapeia entradas às saídas desejadas (*e.g.* redes neurais artificiais, classificação bayesiana, regressão linear de mínimos quadrados, regressão logística, máquina de vetor suporte, bem como árvores e florestas de decisão); aprendizagem não supervisionada, que modelam exclusivamente um conjunto de entradas sem que essas sejam necessariamente vinculadas às saídas (*e.g.* sistemas de agrupamento, decomposição em valores singulares e análise de componentes principais) (82).

O presente trabalho não pretende exaurir os métodos e algoritmos de IA, mas dada a complexidade das vias de suscetibilidade à hanseníase, empregamos o algoritmo de aprendizagem supervisionada *Random Forest* a fim de criar uma chave de diagnóstico clínico no estilo triagem de Manchester (83, 84). Tal ferramenta tem potencial para ser extremamente útil ao serviço público de saúde, sendo retratada com maior riqueza de detalhes ao longo do presente trabalho cuja hipótese é que a probabilidade de adoecimento dos indivíduos expostos aos fatores de risco à hanseníase possa ser estimada por meio de algoritmo de IA treinado a partir dos casos e controles, considerando os parâmetros clínicos e imunológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar padrões moleculares, clínicos e/ou imunológicos para criação de algoritmo da suscetibilidade e evolução clínica da Hanseníase baseado em inteligência artificial, em um estudo caso-controle.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- . Avaliar e comparar os perfis sociodemográficos, clínicos, imunológicos e genéticos dos participantes do estudo pertencentes a casos, controles e contatos;
- . Genotipar polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em genes associados a resposta imunológica em um estudo caso-controle em hanseníase;
- . Verificar se há associação entre os polimorfismos genéticos e as variáveis imunológicas e a hanseníase;
- . Utilizar parâmetros demográficos, clínicos e imunológicos para obter um modelo de IA eficiente que capte a interação de variáveis relacionadas ao risco de desenvolver a hanseníase.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DEFINIÇÃO DA AMOSTRA DE ESTUDO

O estudo proposto foi retrospectivo, do tipo caso-controle (85), dado à dificuldade de recrutar pacientes que adoecem no seguimento (contatos suscetíveis). O estudo foi desenvolvido nos municípios de Governador Valadares e de Mantena (especificamente no distrito de Limeira de Mantena), no estado de Minas Gerais. Foram envolvidas pessoas atendidas no Centro de Referência e Doenças Endêmicas e Programas Especiais (CREDEN-PES, SMS/GV) ou pela Estratégia de Saúde da Família (ESF) da comunidade rural do distrito Limeira de Mantena.

Para estimar um tamanho amostral razoável para o presente estudo, adotamos um nível de confiança de 95,0% e um poder do teste de hipótese de 80,0%. Além disso, adotamos uma suposição conservadora de que os indivíduos expostos ao fator de risco (convívio com doentes) teriam pelo menos duas vezes mais chances de adoecer que os não expostos. Dessa forma, nossa amostra foi constituída de pacientes com hanseníase, recém diagnosticados ($n_1 = 77$), comparados com os indivíduos controles ($n_2 = 68$) sem qualquer sinal de hanseníase ou outras doenças clinicamente similares. Para cada indivíduo infectado com o *M. leprae*, buscou-se um indivíduo controle de mesmo gênero e idade, residente da mesma localidade. Além disso, analisamos um grupo de contatos domiciliares ($n_3 = 93$) a fim de inferir seu estado de saúde baseado em seus perfis clínicos, imunológicos e moleculares ao longo do tempo, garantindo cobertura e qualidade adequadas do serviço de saúde frente a essa enfermidade (86). Vale dizer que o Ministério da Saúde do Brasil (MSB) enquadra como contato domiciliar qualquer pessoa que resida ou tenha residido com um doente de hanseníase, por qualquer período de tempo que seja, e amplia essa vigilância para os contatos sociais: indivíduos que mantiveram contato próximo e prolongado com o doente não tratado, mesmo que não possua grau de parentesco(87). Considerados esses três grupos (casos, controles e contatos), tivemos um total de 238 participantes do presente estudo.

Foram recrutados indivíduos com idade igual ou superior a 5 anos. Os casos de hanseníase recém diagnosticados e não tratados foram convidados a participar do estudo, através do CREDEN-PES ou pela ESF de Limeira de Mantena. Os casos foram confirmados por um dermatologista com experiência em hanseníase e o exame de BAAR (Bacilos Álcool-Ácido Resistentes) foi realizado em todos os casos para determinar o índice bacilar. Os casos foram classificados como indeterminados, tuberculóides, limítrofes ou lepromatosos, com base na Classificação de Madri (88).

Os indivíduos que apresentavam uma convivência estreita com os casos, como os membros da família que moram com o caso índice ou que moravam nas proximidades e mantinham contato semanal regular com o caso, foram incluídos no grupo de contato. O grupo controle foi composto por aqueles indivíduos que não apresentavam contato prévio com os casos. Todos os contatos e controles foram avaliados clinicamente para garantir que não apresentassem sinais ou sintomas de infecção por hanseníase.

Tanto pacientes como contatos e controles, após considerados os critérios de inclusão e exclusão, foram apresentados à proposta da pesquisa e somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) os participantes foram incluídos no estudo. A partir da inclusão no estudo, todos os participantes da pesquisa (casos, contatos e controles) foram entrevistados para registro das informações socioeconômicas e condições de saúde (Anexo A).

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Tanto pacientes como contatos e controles, após considerados os critérios de inclusão e exclusão, foram apresentados à proposta do estudo. Somente após assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) os participantes foram incluídos no estudo. O Protocolo de Pesquisa e o TCLE foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF (CEP/UFJF), credenciado pelo CONEP sob o CAAE 71057317.5.0000.5147 (Anexo 1).

Não foram incluídos pacientes com idade inferior a 5 anos, mulheres grávidas, história de diagnóstico de hanseníase, pacientes portadores de doença mental ou deficiência física, etnia indígena e que relataram queixa de alguma doença do trato gastrointestinal associada com perda de peso.

Os voluntários receberam uma explanação da natureza e dos objetivos do estudo. Foi enfatizado que o estudo tem a finalidade de pesquisa, e que o voluntário não poderá esperar que haja qualquer efeito terapêutico. O voluntário também entendeu que ele(a) é livre para se retirar a qualquer momento do estudo sem ser obrigado a fornecer o motivo de fazê-lo e sem que isto cause qualquer prejuízo no seu atendimento. Foi de responsabilidade dos investigadores a obtenção da assinatura do TCLE.

3.3 COLETA DE DADOS DEMOGRÁFICOS E AVALIAÇÃO CLÍNICA

Em relação aos dados primários obtidos nesse trabalho, foram utilizadas a estratégia de busca ativa. Os médicos e estudantes de medicina da equipe aplicaram procedimentos técnicos de anamnese, coletaram informações socioeconômicas e demográficas, bem como realizaram o exame dermatoneurológico preconizado pelo MSB.

Quanto ao agrupamento dos indivíduos envolvidos no estudo, os mesmos foram classificados como: doentes, contatos ou controles. Dentre esses, os doentes foram classificados ainda seguindo o protocolo de Madri e Operacional. No primeiro protocolo classificaram-se os pacientes doentes como tuberculóides, indeterminados, dimorfos ou virchowianos, enquanto que em relação ao protocolo Operacional classificaram-se os doentes em: PB ou MB.

Informações sobre o grau de conhecimento acerca da hanseníase também foram coletadas a fim de tentar mensurar o grau de desconhecimento remanescente em regiões rurais e periféricas de áreas endêmicas como a cidade de Governador Valadares. Para fins de registro das análises desenvolvidas no projeto e apresentadas nesse trabalho, foi aplicado um questionário que contempla todas as informações supracitadas (Anexo A).

3.4 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

As quantificações de citocinas e quimiocinas abordadas neste estudo foram dados secundários obtidos por outros membros da equipe de pesquisa a que estamos vinculados. Em regime de colaboração e coautoria, fomos autorizados a utilizar esses dados a fim de contextualizar com os parâmetros moleculares em busca de soluções do problema comum: a hanseníase. Além disso, os parâmetros imunológicos e laboratoriais, gentilmente cedidos pela colaboradora Lorena Bruna Pereira de Oliveira (89), consistem em informações importantes para o estudo da hanseníase em si e não poderiam deixar de compor o presente trabalho.

A seguir, resumimos os procedimentos realizados por nossos colaboradores. Para maiores esclarecimentos acerca das técnicas aplicadas nos ensaios imunológicos em questão, sugerimos a leitura do trabalho de Oliveira (89).

3.4.1 Quantificação de citocinas e quimiocinas

Foram coletados sobrenadantes de três culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC): SE, cultura sem estímulo; PHA, cultura com estímulo inespecífico (para checar viabilidade celular); ML, cultura com estímulo específico do *M. leprae*. A partir desse material, foram quantificados os níveis de citocinas e quimiocinas utilizando-se o sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) da *Becton Dickinson-BD*. Esse sistema emprega uma mistura de sete esferas de poliestireno para citocinas e cinco esferas de poliestireno para quimiocinas de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas e quimiocinas humanas. Essa metodologia permitiu a avaliação simultânea de diversas citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17) no mesmo ensaio, empregando-se pequenos volumes de amostra. O mesmo foi realizado para as quimiocinas (CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10).

As misturas de esferas de captura, adsorvidas com anticorpos monoclonais anti-IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17 para *Human Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit* e anticorpos monoclonais anti-CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10 para *CBA Human Chemokine Kit* foram subsequentemente incubadas por 3 horas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após outros procedimentos sequenciais de laboratório, específicos para esses tipos de ensaios, as esferas foram imediatamente analisadas no FACS VERSE (*BD Biosciences*), equipamento quantifica as citocinas na escala de *pg/mL*.

O manual de instruções do *Human Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit* (Catálogo N^o 560484, p. 17) preconiza que leituras de citocina acima de 5000 *pg/mL* ou abaixo de 20 *pg/mL* estejam fora das faixas de concentração contempladas pela curva padrão do *Kit* e sugere que sejam realizadas diluições nas amostras. De maneira semelhante, nas quimiocinas, o manual *CBA Human Chemokine Kit* (Catálogo N^o 552990, p. 21) recomenda que sejam reconsideradas as leituras acima de 2500 *pg/mL* ou abaixo de 10 *pg/mL*. Tais recomendações foram observadas nesse trabalho de forma que as quantificações fora das citadas faixas de referência foram consideradas excluídas das análises e portanto tratadas como valores faltantes (*missing values*). O tratamento desses dados faltantes será abordado mais adiante no presente trabalho.

3.5 ENSAIOS DE GENOTIPAGEM

3.5.1 Coleta e preparo de material biológico

A coleta de sangue dos participantes para extração de DNA genômico (*gDNA*) e posterior genotipagem dos SNPs foi realizada no dia da consulta nos eventos de busca ativa do projeto. Coletaram-se cerca de 3,0 *mL* de sangue venoso em tubo marca VACUPLAST contendo 1,0 *mg/mL* do anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA). No laboratório Biologia Celular e Genética Molecular da UFJF, *campus* Governador Valadares, realizou-se a centrifugação dos tubos a 3000 rotações por minuto (RPM) por cinco minutos para separação da camada de leucócitos que foi retirada com o auxílio de micropipeta e microponteira com filtro, livres de *DNAse* e *RNAse*. Os leucócitos foram depositados em microtubos de 1,5 *mL*, livres de *DNAse* e *RNAse*, devidamente identificados e armazenados a -20°C . A extração do DNA genômico (*gDNA*) foi realizada com alíquota de 250 μL da camada de leucócitos utilizando o *Illustra[®] blood genomicPrep Mini Spin Kit*, *GE Healthcare*, de acordo com instruções do fabricante.

A quantificação e a determinação do grau de pureza do *gDNA* extraído foram realizados no espectrofotômetro *Nano Vue plus* (*GE[®]*). A amostra foi previamente incubada à 56°C durante cinco minutos em banho seco e homogeneizada posteriormente para garantir a solubilidade do *gDNA*. Dois microlitros da amostra de DNA foram depositados no espectrofotômetro previamente calibrado com tampão Tris-EDTA. O grau de pureza foi determinado a partir das razões dos valores de absorbância nos comprimentos de onda A260/A280 e A260/A230. A razão A260/A280 representa a contaminação por proteínas, e o valor desta razão deveria estar entre 1,7 e 1,9. A razão de A260/A230 deveria estar no intervalo entre 1,5 e 2,5. Valores fora desses intervalos indicavam contaminação por compostos orgânicos e o *gDNA* era descartado. O *gDNA* foi armazenado a -20°C devidamente identificado no biorrepositório da pesquisa. No momento de uso, o *gDNA* foi diluído para a concentração requerida nas reações.

3.5.2 Genotipagem dos SNPs selecionados

Todas as amostras de *gDNA* extraídas foram diluídas para a concentração de 5,0 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ em água ultra-pura, livre de *DNAse* e *RNAse*. As variantes de baixa frequência (entre 0,01 e 0,05) e as variantes comuns (frequência $> 0,05$) em genes selecionados por sua associação com a resposta imunológica foram genotipadas na população em estudo. Os dados dos genes e as referências dos respectivos SNPs estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados dos genes e SNPs selecionados para genotipagens.

Gene e Locus	Referência SNP	Alelo do SNP e fluoróforo (VIC/FAM)	Região	Nº do ensaio (Applied Biosystems)	MAF
TLR1 4p14	rs4833095	C/T	Éxon	C_44103606_10	T (0,43)
TLR2 4q31.3	rs3804099	C/T	Éxon	C_22274563_10	C (0,41)
TLR4 9q33.1	rs1927914	A/G	Promotora	C_2704048_10	G (0,49)
TLR4 9q33.1	rs2149356	G/T	Íntron	C_11270899_20	T (0,48)
TLR4 9q33.1	rs2737190	A/G	Promotora	C_2704047_10	G (0,49)
TLR4 9q33.1	rs4986790	A/G	Éxon	C_11722238_20	G (0,06)
SLC11A1 2q35	rs17235416	TGTG/del	3'UTR	C_57889747_20	del (0,21)
IL-10 1q32.1	rs1554286	G/A	5'UTR	C_8828812_10	A (0,41)
IL-10 1q32.1	rs3024490	A/C	Íntron	C_15983670_20	A (0,44)
IL-10 1q32.1	rs1800872	T/G	Íntron	C_1747363_10	T (0,43)
IL-10 1q32.1	rs1800871	A/G	Íntron	C_1747362_10	A (0,43)

MAF – Frequência da variante rara extraída do Projeto 1000 Genomas.

Fonte: Applied Biosystems e 1000 Genomes Project.

Para os ensaios de genotipagens de SNPs foi utilizada a metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR do inglês *Quantitative Polymerase Chain Reaction*), baseada em fluorescência usando sondas TaqMan MGB e um par de iniciadores de PCR para detectar alvos SNPs específicos (*ThermoFisher*[®]) validados. Estes ensaios foram desenvolvidos na plataforma do sistema da *7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems*[®]).

As sondas que distinguem os dois alelos do SNP, marcadas com fluoróforos VIC/MGB-NFQ (alelo um) ou FAM/MGB-NFQ (alelo dois), na concentração de 40× foram diluídas duas vezes em tampão TE (20,0 μ L de *Tris* 100mM e dois μ L de EDTA 100mM). Em um microtubo, foram adicionados solução *Master Mix TaqMan*[®] *GTXpress*TM *Master Mix* (2×), sonda (20×), água ultrapura, livre de *DNAse* e *RNAse* com volumes calculados para o volume total de ensaios e de acordo com as especificações do fabricante.

Seis microlitros desta mistura foram aliquotados em microplaca e adicionados, em cada poço correspondente a um teste individual, 20ng de DNA ($4\mu\text{L}$ de gDNA a $5\text{ng}/\mu\text{L}$). No equipamento *Termociclador 7500 Fast*, (*Applied Biosystems*[®]) foi definido o programa de amplificação nos seguintes ciclos de temperatura: Pré qPCR: 60°C por 1 minuto e 95°C por 20 segundos, seguindo-se de 40 ciclos a 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos e uma etapa final de 60°C por 1 minuto. Os resultados da amplificação e a determinação dos genótipos foram obtidos com auxílio da plataforma *Thermo Fisher Cloud*.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Dada a natureza e a complexidade do problema abordado no presente trabalho, presumimos que uma abordagem multivariada teria maior potencial de elucidação que abordagens convencionais. Contudo, análises descritivas elementares foram aplicadas a fim de caracterizar a amostra de estudo, assim como medidas de razão de chances foram empregadas para, preliminarmente, medir a importância dos SNPs avaliados no estudo caso-controle em questão.

Embora utilizemos de variadas abordagens para o entendimento do contexto de estudo, este trabalho foi conduzido majoritariamente por modelagem via IA. A seguir, são apresentadas metodologias utilizadas a fim de otimizar os resultados e minimizar, ou mesmo eliminar, possíveis vieses de interpretação inerentes a análises multivariadas.

3.6.1 *Softwares e pacotes*

Neste trabalho utilizamos exclusivamente o R (90) para realização das análises estatísticas, dada sua robustez e imensa gama de pacotes disponíveis gratuitamente para resolução dos mais variados tipos de problemas presentes no cotidiano da pesquisa.

O R, software estatístico gratuitamente distribuído em <https://www.r-project.org> (90), permite a inteira personalização dos projetos e até mesmo a criação de funções e pacotes autorais. Seguem abaixo os pacotes de terceiros utilizados no presente trabalho, com suas respectivas referências:

`FactoMineR` (91), para aplicar a PCA;

`factoextra` (92), para construir os gráficos de PCA da Figura 9.

`SNPassoc` (93), para construir os modelos genéticos e suas respectivas razões de chances presentes nas Tabelas 9 a 11;

`HardyWeinberg` (94), para verificar se a frequência dos genótipos da amostra (Tabela 7) permanecem em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (95);

`ggplot2` (96), para construir o gráfico apresentado na Figura 10;

`rgl` (97), para visualização tridimensional dos dados após aplicação da PCA da Figura 13A;

`randomForest` (98), para criar os modelos de IA que resultaram nos dados apresentados na Tabela 14;

`Boruta` (99), para reduzir a quantidade de variáveis utilizadas na modelagem a partir de IA;

`caret` (100), para medir a qualidade dos modelos de IA apresentados na Figura 14;

3.6.2 Tratamento dos dados

3.6.2.1 Valores faltantes (*missing values*)

Dados ausentes ocorrem quando nenhum valor de dados é armazenado para a variável em uma observação ou quando os dados armazenados são tão inconsistentes que necessitam ser considerados inexistentes. De uma forma ou de outra, são uma ocorrência bastante comum e que, caso não tratados, podem ter um efeito significativo nas conclusões acerca dos dados (101).

A imputação de dados é um tema abordado na literatura a fim de preencher as recorrentes lacunas observadas na etapa de análises de dados (102, 103). Nesse trabalho, mantivemos a mesma linha de pensamento da modelagem em inteligência artificial para imputar os valores faltantes, como descrito a seguir.

3.6.2.2 Imputação

A imputação de valores aos dados faltantes desse trabalho foi realizada utilizando a função `rfImpute` do pacote `randomForest` (98) que, resumidamente, busca iterativamente o melhor valor condizente com a estrutura multidimensional do banco de dados.

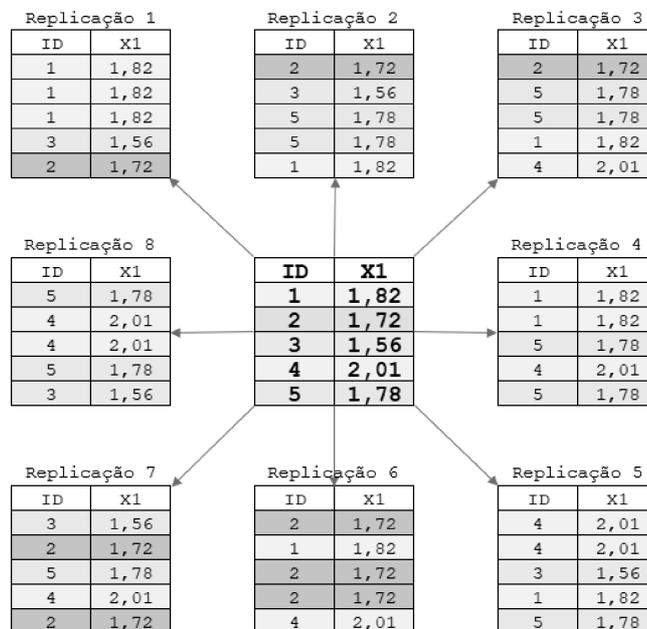
O algoritmo começa imputando valores para os *missing values* (NAs) dependendo da natureza das variáveis: nas quantitativas, imputa-se pela mediana dos valores; nas qualitativas, imputa-se pela moda. Em seguida, o algoritmo *Random Forest* é aplicado aos dados completos e então matriz de proximidade desse método é usada para atualizar a imputação dos valores faltantes originais. Para preditores contínuos, o valor imputado é a média ponderada das observações não ausentes, em que os pesos são as proximidades. Para preditores categóricos, o valor imputado é a categoria com a maior proximidade média. Este processo é repetido até que um parâmetro de convergência seja alcançado.

3.6.2.3 Bootstrapping

Observadas as distribuições de frequência dos parâmetros imunológicos presentes nesse estudo, decidimos aplicar uma abordagem que seja mais robusta a valores discrepantes ou faltantes, bem como seja aplicável em amostras menores. Nesse sentido, aplicamos uma técnica conhecida na literatura como *bootstrapping* que usa amostragem aleatória com reposição (104). Esta técnica permite estimar a distribuição amostral de quase qualquer estatística usando métodos de amostragem aleatória (105). Essa técnica foi aplicada para simular a produção de citocinas e quimiocinas estimulada pelo *M. leprae* em função das variantes genéticas analisadas no presente trabalho.

Para ilustrar o método, suponha que estamos interessados na altura média das pessoas em todo o mundo. Obter informações de todos os habitantes da terra seria humanamente impraticável, daí a natural necessidade de um processo de amostragem. Suponha então que coletemos uma amostra de tamanho n ; ou seja, medimos as alturas de n indivíduos. Dessa única amostra, apenas uma estimativa da média pode ser obtida, mas para inferirmos sobre a população, precisamos ter alguma noção da variabilidade da média que calculamos. O método de *bootstrap* mais simples envolve pegar o conjunto de dados original de alturas e, usando um computador, fazer uma amostragem com reposição para formar uma nova amostra (reamostragem ou amostra *bootstrap*) que também é de tamanho n . Esse processo é repetido geralmente 1.000 ou 10.000 vezes e, para cada uma dessas amostras de *bootstrap*, calculamos sua média e/ou qualquer outra estatística de interesse. A Figura 5 denota o procedimento de reamostragem (seis vezes) em relação ao que foi ilustrado aqui. A partir da distribuição das “reamostras” é possível construir, por exemplo, intervalos de confiança robustos baseando-nos nos percentis 5 e 95. Nas citocinas e quimiocinas mensuradas no presente trabalho, aplicamos o método com 10.000 replicações. Vale ressaltar também que o método de *bootstrapping* é utilizado no algoritmo de reconhecimento de padrões - *Random Forest* - explicado a diante no item sobre modelagem *via* inteligência artificial.

Figura 5 – Ilustração do processo de *bootstrapping*.



Fonte: Produção autoral com dados fictícios, ressaltando em cores o processo de amostragem com reposição.

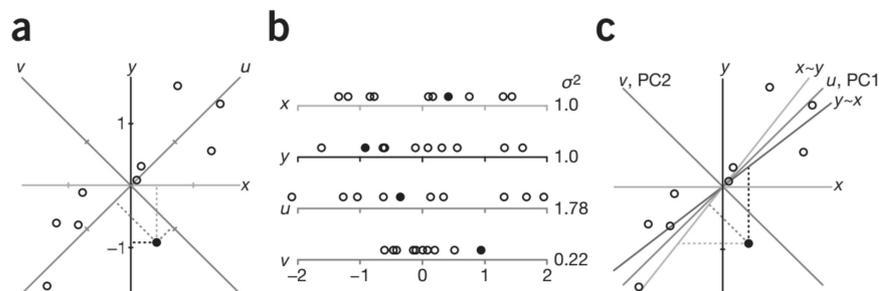
3.6.2.4 Análise de Componentes Principais

Considerando uma possível redundância dos dados, decidimos primeiramente realizar uma seleção das variáveis, tomando como base o algoritmo Boruta (99). Trata-se de um método iterativo de seleção de variáveis que considera um modelo específico de classificação (e.g. *Random Forest*) para discernir quais recursos são realmente importantes para alcançar a maior acurácia possível (106). A partir dos dados restantes dessa primeira triagem, dispomos ainda de uma quantidade razoável de variáveis quantitativas e qualitativas no estudo. Considerando a hipótese de que as variáveis imunológicas sejam correlacionadas (ver Figura 3) julgamos pertinente a realização de uma análise fatorial, especificamente a técnica denominada *Análise de Componentes Principais* (ACP) (91).

A análise fatorial, em si, é um método estatístico usado para descrever a variabilidade total dos dados em um conjunto reduzido de fatores que, por sua vez, são decomposições lineares e independentes entre si das variáveis originais analisadas. Por exemplo, é possível que variações presentes em centenas de variáveis observadas sejam refletidas principalmente em apenas uma dezena de variáveis subjacentes (fatores) (107).

Dados com muitas dimensões são muito comuns em biologia na mensuração de diversos parâmetros genéticos, imunológicos, hematológicos, fisiológicos, anatômicos etc. A análise desse tipo de dados geralmente apresenta vários desafios como custo computacional e um aumento da taxa de erro devido à multicolinearidade e redundância das variáveis analisadas (108). A ACP é um método de reconhecimento de padrão do tipo não supervisionado (encontra padrões sem referência ao conhecimento prévio sobre as amostras) que mitiga essas limitações das abordagens univariadas (109). A Figura 6 ilustra a formulação do espaço reduzido na ACP.

Figura 6 – Representação geométrica dos dados no espaço reduzido pela ACP.

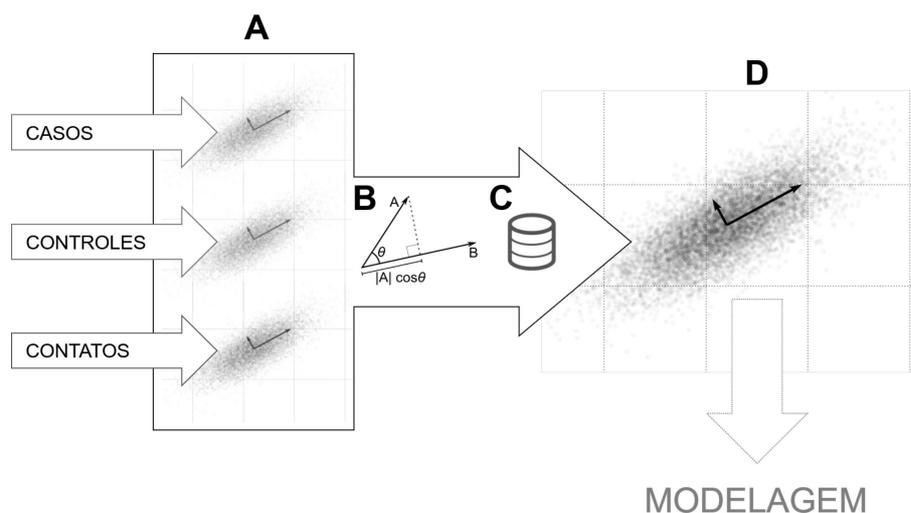


Fonte: Trabalho de Lever e colaboradores, em 2017 (110).

A primeira dimensão é escolhida para minimizar a distância total entre os dados e sua projeção no eixo que, por sua vez, minimiza a variância dos pontos projetados. A segunda dimensão (e subsequentes) é selecionada de forma semelhante, com o requisito adicional de que sejam independentes (*i.e.* não correlacionadas) das demais dimensões (110). Na Figura 6 percebe-se que o eixo da primeira dimensão não é definido por regressão linear de y vs x ($y \sim x$, marrom escuro) nem de x vs y ($x \sim y$, marrom claro). Em suma, a ACP é uma técnica que maximiza a variância dos dados originais em um espaço reduzido, concomitantemente anulando as colinearidades presentes nas variáveis originais. É uma etapa que otimiza o processo de reconhecimento de padrões.

Vale lembrar que não é intuito do presente trabalho discorrer sobre todos os detalhes da ACP nem sobre outras análises fatoriais, visto que esta técnica foi utilizada exclusivamente para verificação de perfis imunológicos dos grupos de estudo e como um método de redução e normalização de dados, ilustrado pela Figura 7.

Figura 7 – Ilustração do processo de preparação dos dados imunológicos para modelagem por inteligência artificial.



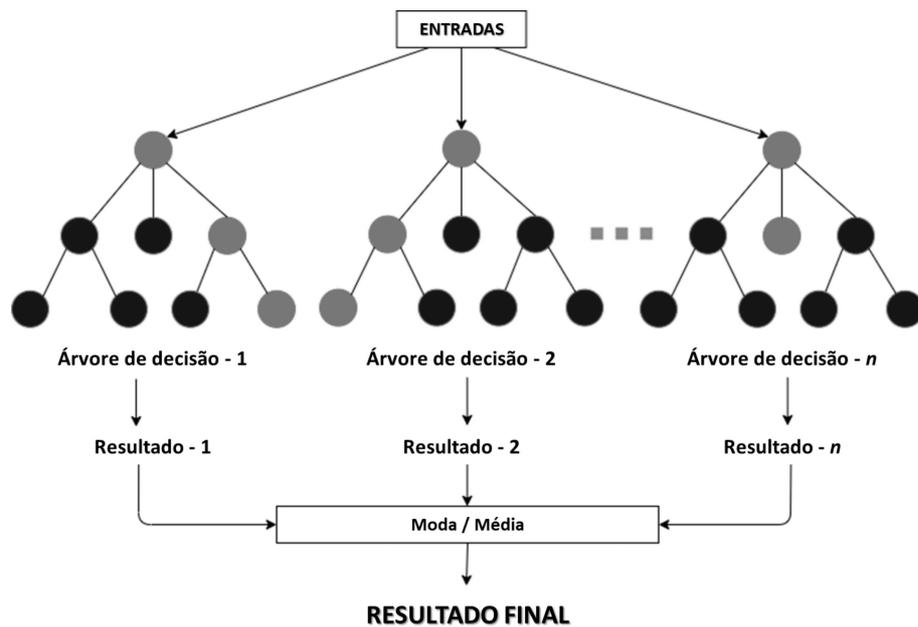
Fonte: Produção autoral, de forma que: A - aplicação de ACP nos grupos, independentemente; B - reescalonamento de A pela projeção dos indivíduos nos vetores das variáveis; C - concatenação dos dados gerados em B; D - aplicação de nova ACP nos dados organizados em C.

Nesse processo, primeiramente os dados foram separados em grupos (casos, controles e contatos) e então foram aplicadas análises de componentes principais em cada grupo, separadamente. Em seguida, concatenaram-se as projeções dos indivíduos em cada variável em seu respectivo grupo. Finalmente, a partir desses dados concatenados, realizamos uma segunda análise de componentes principais a fim de que os dados sejam reescalados para a subsequente etapa do estudo de reconhecimento de padrões.

3.6.3 Modelagem *via* Inteligência artificial

Na literatura, encontramos vários métodos de aprendizado de máquina supervisionado específicos para tarefas de classificação (*e.g.* doentes *vs* sadios) como, para citar alguns exemplos: análise de regressão logística, análise discriminante, *k-nearest neighbors*, máquina de vetor suporte, árvore de decisão, *naive Bayes* e *Random Forest* (RF) (111). O algoritmo RF está ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Fluxograma ilustrativo dos processos inerentes ao algoritmo *Random Forest*.



Fonte: Adaptado da *internet* (autor desconhecido). Em verde, as opções escolhidas entre as opções disponíveis em azul, em cada decisão.

Para análise dos dados do presente estudo, utilizamos modelos de classificação baseados em IA e análise multivariada para padronização dos dados. Especificamente na modelagem por IA, utilizamos o algoritmo *Random Forest* (RF) definido como um tipo de *ensemble learning* (aprendizado em bloco) que agrega precisão aos resultados (112). Além de sua reconhecida acurácia em nossos trabalhos anteriores (113), adotamos o RF também em função de sua praticidade de implementação em dispositivos eletrônicos (*e.g. PCs, SmartPhones, SmartTVs* etc) que tem apelo substancial ao que defendemos como disseminação de métodos de apoio ao diagnóstico. Esse algoritmo RF, ilustrado pela Figura 8, gera múltiplas e aleatórias árvores de decisão a fim de classificar com bastante acurácia os indivíduos em “casos” ou “controles”. Assim, esse mesmo modelo seria capaz de prever o suposto desenvolvimento da hanseníase no grupo dos contatos pelo reconhecimento do padrão de suas variáveis imunológicas.

4 RESULTADOS

4.1 ASPECTOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS

A fim de conhecermos as características e peculiaridades da amostra de estudo, no que tange à parte clínica e caracterização da amostra, dispomos algumas estatísticas descritivas nas Tabelas 2 a 4. Essas estatísticas resumem, pelo menos em nossa amostra, a natureza heterogênea das manifestações da hanseníase. Ao longo desse capítulo abordaremos associações, redundâncias e até mesmo possíveis exclusões de variáveis a fim de alcançar o melhor modelo de reconhecimento de padrões das vias de susceptibilidade dessa bacteriose.

Em relação às variáveis demográficas propriamente ditas, 50,4% dos participantes eram mulheres, 70,2% possuíam pele parda ou preta, 54,2% moravam em zona urbana e 85,3% moravam há mais de cinco anos na região (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização da amostra em razão das variáveis demográficas qualitativas abordadas no estudo.

Variável	Categoria	Caso (77)		Contato (93)		Controle (68)		Total (238)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
GÊNERO	Feminino	34	44,2	55	59,1	31	45,6	120	50,4
	Masculino	43	55,8	38	40,9	37	54,4	118	49,6
COR DA PELE	Não declarada	11	14,3	5	5,4	0	0	16	6,7
	Indígena	1	1,3	0	0	0	0	1	0,4
	Branca	12	15,6	25	26,9	14	20,6	51	21,4
	Amarela	0	0	2	2,1	1	1,5	3	1,3
	Parda	39	50,6	48	51,6	41	60,3	128	53,8
	Preta	14	18,2	13	14	12	17,6	39	16,4
LOCAL DE MORADIA	Não declarado	5	6,5	0	0	0	0	5	2,1
MORADIA	Zona rural	36	46,8	36	38,7	32	47,1	104	43,7
	Zona urbana	36	46,8	57	61,3	36	52,9	129	54,2
TEMPO DE MORADIA	Não declarado	14	18,2	6	6,4	3	4,4	23	9,7
MORADIA	Menos de 1 ano	2	2,6	2	2,1	0	0	4	1,7
	Entre 1 e 5 anos	4	5,2	3	3,2	1	1,5	8	3,4
	Mais de 5 anos	57	74	82	88,2	64	94,1	203	85,3

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Pela Tabela 3, podemos verificar que os participantes da pesquisa possuíam média de idade de aproximadamente 40 anos, sendo que o participante mais novo e o mais velho possuíam 5 e 85 anos, respectivamente.

Tabela 3 – Caracterização da amostra em razão da variável quantitativa idade, em anos, complementando as informações demográficas da Tabela 2.

Variável	Grupo	n	Min	q1	Mediana	Média	q3	Max	s	IIQ
IDADE	Caso	77	6	25	46	43,1	58	80	20,4	33
	Contato	93	5	18	33	34,2	48	85	19,5	30
	Controle	68	10	21	43	41,4	57,5	83	20,9	36,5
	Geral	238	5	20	39	39,2	55	85	20,5	35

n = quantidade de participantes; *Min* e *Max* = menor e maior valores observados; *q1* e *q3* = primeiro e terceiro quartis; *s* = desvio padrão; *IIQ* = intervalo interquartilico ($q3 - q1$).

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Quanto às variáveis clínicas apresentadas na Tabela 4, 39,1% dos participantes eram contatos domiciliares, 28,6% eram controles e os casos (32,3%) se dividiam em paucibacilares (28,6%) e multibacilares (71,4%). Cerca de 32,8% dos participantes apresentaram casos de hanseníase na família. Quanto a vacinação BCG que potencialmente auxiliaria na prevenção da doença, percebeu-se que 76,4% dos indivíduos apresentaram pelo menos uma cicatriz de vacina BCG. No geral, a maioria dos participantes da pesquisa não apresentou lesões cutâneas, sejam elas manchas, áreas hipocrômicas ou placas dérmicas. Esse perfil era mais característico dos casos, conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização da amostra em razão das variáveis clínicas abordadas no estudo.

Variável	Categorias	Caso (77)		Contato (93)		Controle (68)		Total (238)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL	Contato	0	0	93	100	0	0	93	39,1
	Controle	0	0	0	0	68	100	68	28,6
	Multibacilar	55	71,4	0	0	0	0	55	23,1
	Paucibacilar	22	28,6	0	0	0	0	22	9,2
HISTÓRICO DE HANSENÍASE NA FAMÍLIA	Sim	21	27,3	51	54,8	0	0	72	30,2
	Não	25	32,5	30	32,3	54	79,4	109	45,8
	Não sabe	31	40,3	12	12,9	14	20,6	57	24
CASOS DE HANSENÍASE NA RESIDÊNCIA	Nenhum	46	59,7	29	31,2	64	94,1	139	58,4
	Um	23	29,9	53	57	4	5,9	80	33,6
	Dois	6	7,8	5	5,4	0	0	11	4,6
	Três ou mais	0	0	4	4,3	0	0	4	1,7
	Não respondeu	2	2,6	2	2,1	0	0	4	1,7
CICATRIZ DE BCG	Nenhuma	27	36,5	17	18,5	11	16,4	55	23,6
	Uma	34	46	51	55,4	44	65,7	129	55,4
	Duas	13	17,6	24	26,1	12	17,9	49	21
GRAU DE INCAPACIDADE DEVIDO À HANSENÍASE	Não aplicável	0	0	93	100	68	100	161	68
	Grau zero	48	62,3	0	0	0	0	48	20,2
	Grau um	28	36,4	0	0	0	0	28	11,8
	Grau dois	0	0	0	0	0	0	0	0
	Não avaliado	1	1,3	0	0	0	0	0	0
LESÕES CUTÂNEAS	Nenhuma	38	49,4	89	95,7	65	95,6	192	80,7
	Uma	18	23,4	3	3,2	1	1,5	22	9,2
	Duas ou mais	21	27,3	1	1,1	2	2,9	24	10,1
MANCHAS NA PELE	Nenhuma	48	62,3	91	97,8	64	94,1	203	85,3
	Uma	19	24,7	1	1,1	1	1,5	21	8,8
	Duas ou mais	10	13	1	1,1	3	4,4	14	5,9
ÁREAS HIPOCRÔMICAS HIPOESTÉSICAS	Nenhuma	32	41,6	91	97,8	68	100	191	79,9
	Uma	18	23,4	2	2,1	0	0	21	8,8
	Duas ou mais	27	35,1	0	0	0	0	27	11,3
PLACAS DÉRMICAS	Nenhuma	69	89,6	92	98,9	68	100	229	96,2
	Uma	7	9,1	1	1,1	0	0	8	3,4
	Duas ou mais	1	1,3	0	0	0	0	1	0,4
NÓDULOS	Nenhum	74	96,1	93	100	68	100	235	98,7
	Um	1	1,3	0	0	0	0	1	0,4
	Dois ou mais	2	2,6	0	0	0	0	2	0,8
INFILTRAÇÕES	Nenhuma	75	97,4	92	98,9	68	100	235	98,7
	Uma	1	1,3	1	1,1	0	0	2	0,8
	Duas ou mais	1	1,3	0	0	0	0	1	0,4
ESPESSEMENTOS DE NERVOS PERIFÉRICOS	Nenhum	51	66,2	89	95,7	68	100	208	87,4
	Um	8	10,4	3	3,2	0	0	11	4,6
	Dois ou mais	18	23,4	1	1,1	0	0	19	8

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

4.2 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

Em relação às citocinas e quimiocinas estudadas no presente trabalho, observamos alguns dados faltantes (*missing values*) em função de algumas amostras não apresentarem resultados compatíveis com os níveis padronizados pelo KIT. Contudo, obtivemos material suficiente para construir as Tabelas 5 e 6 que revelam as estatísticas da mensuração dessas proteínas a partir de cultura de células dos grupos Caso, Controle e Contato.

Na Tabela 5, o fator de necrose tumoral (TNF) apresentou diferença significativa entre os grupos de estudo na cultura de células estimuladas (ML) pelo *M. leprae*, ao contrário das culturas de células sem estímulo. Contudo, não observamos diferença entre as medianas dos grupos Caso, Contato e Controle quanto a mediana de produção das demais citocinas analisadas no presente estudo. Na Tabela 6, apresentamos algumas estatísticas das quimiocinas analisadas no presente estudo. Foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significativas entre a mediana de produção dessas proteínas nos grupos Casos, Controles e Contatos. Tanto a cultura de células estimuladas pelo *M. leprae* quanto a cultura de células não estimulada apresentaram aumento na produção das quimiocinas IL-8 e RANTES.

De forma complementar aos resultados observados na análise univariada dos parâmetros imunológicos, as citocinas e quimiocinas também foram analisadas de maneira multivariada por Análise de Componentes Principais (ACP). Essa abordagem visou analisar a informação conjunta que essas moléculas podem trazer a fim de reconhecermos padrões frente a infecção pelo *M. leprae*, uma vez que abordagens univariadas não contemplam as interações inerentes a essas proteínas no complexo contexto biológico.

Antes de prosseguirmos com as análises desse estudo, frisamos que a ACP exige prévia correção dos dados como a normalização e imputação (ou remoção) de valores faltantes. Como observado anteriormente, nossos dados apresentaram *missing values* que até certo ponto eram esperados no que diz respeito à coleta e ao registro de parâmetros biológicos. Para resolver esse impasse a fim de aplicarmos a ACP, recorreremos à imputação de valores por meio da função `rfImpute` do software R que basicamente busca preencher os dados faltantes com valores mais prováveis considerando o perfil dos indivíduos do estudo. Em resumo, aplicamos um algoritmo robusto o suficiente para que a imputação não fosse realizada indiscriminadamente por medidas de tendência central que não consideram as diferentes nuances dos perfis dos indivíduos (que tem grande relevância na resposta imune). Nesse trabalho, omitiremos a caracterização da amostra pós-imputação em função das estatísticas apresentadas nas Tabelas 2 a 6 não terem sofrido modificações relevantes ao que já abordamos previamente.

Tabela 5 – Caracterização da amostra em razão das citocinas analisadas no presente estudo.

Variável	Grupo	n	Min	q1	Mediana	Média	q3	Max	s	IIQ	#NA
IL-17_SE	Caso	49	0,7	2,8	5,3	8,1	9,6	40,8	8,8	6,8	28
	Contato	56	0,4	2,1	6,2	9,8	11,5	44,1	11,2	9,5	37
	Controle	39	0,7	2,9	4,6	10,8	16,2	43,2	12,2	13,3	29
	p = 0,56	Geral	144	0,4	2,6	5,4	9,5	11,5	44,1	10,7	8,9
IL-17_ML	Caso	46	0,7	1,9	5,5	8,3	13,2	27,6	7,6	11,3	31
	Contato	58	0,8	2,1	3,8	5,9	7,1	28,5	5,8	4,9	35
	Controle	40	0,4	3	4,8	7,9	10,8	31,4	7,1	7,8	28
	p = 0,60	Geral	144	0,4	2,3	5	7,2	10,1	31,4	6,8	7,8
IL-4_SE	Caso	40	0,2	0,3	0,6	0,8	0,9	3,1	0,8	0,7	37
	Contato	34	0,2	0,3	0,6	0,8	1,2	3	0,7	0,9	59
	Controle	31	0,2	0,6	0,9	1,1	1,7	2,9	0,9	1,1	37
	p = 0,46	Geral	105	0,2	0,3	0,6	0,9	1,1	3,1	0,8	0,9
IL-4_ML	Caso	27	0,2	0,6	0,6	1,2	1,4	3,9	1	0,8	50
	Contato	37	0,2	0,4	0,6	1	1,2	3,1	0,9	0,8	56
	Controle	25	0,3	0,4	0,8	1,2	1,6	3,1	0,9	1,3	43
	p = 0,55	Geral	89	0,2	0,4	0,6	1,1	1,4	3,9	0,9	1
TNF_SE	Caso	53	0,2	3,8	7,6	12,5	19	50,8	12,8	15,2	24
	Contato	78	0,4	2,2	5,2	10,9	16	54,5	13	13,8	15
	Controle	53	0,4	2,9	8	10	15	31,9	8,5	12,1	15
	p = 0,11	Geral	184	0,2	2,5	6,6	11,1	16	54,5	11,8	13,5
TNF_ML	Caso	49	0,2	4,2	11,4	15,7	25,1	48	14,4	20,9	28
	Contato	79	0,2	2,5	4,8	9,1	11	52,7	11,1	8,5	14
	Controle	58	0,2	3,6	7,6	11,1	16,1	45,1	10,4	12,5	10
	p = 0,0048	Geral	186	0,2	2,8	6,6	11,5	15,8	52,7	12,1	13
IL-6_SE	Caso	66	908,1	7938,8	10458,9	10340,5	12748,5	18234,4	3833,3	4809,7	11
	Contato	87	1292,1	8450,2	11302,3	10780,4	12846,9	19036,4	3792,1	4396,7	6
	Controle	57	862,2	7440,1	9587,1	10060,4	12941,1	18736,3	4452,6	5501	11
	p = 0,42	Geral	210	862,2	8139,4	10654,7	10446,7	12852,1	19036,4	3986,2	4712,7
IL-6_ML	Caso	66	168,7	6259,7	10792,3	9470,4	12387,1	18214,2	4390,2	6127,4	11
	Contato	88	20,5	7439,2	10757,1	9908,3	12307	18778,8	4427,9	4867,8	5
	Controle	59	666,9	6608,1	9566,2	9398,8	12092	18985,6	4356	5483,9	9
	p = 0,59	Geral	213	20,5	6703,6	10601,6	9631,5	12278,3	18985,6	4382	5574,8
IL-2_SE	Caso	59	1	5,4	10,9	17,1	21,9	67,9	16,9	16,5	18
	Contato	76	0,4	4,8	10,4	18,6	25,4	71,9	19,3	20,6	17
	Controle	54	0,4	3,4	12,3	19,3	28,9	65,8	18,8	25,5	14
	p = 0,87	Geral	189	0,4	4,8	11,2	18,3	25,1	71,9	18,4	20,2
IL-2_ML	Caso	62	0,8	7,5	13,1	18,7	25,6	63,1	16	18,1	15
	Contato	77	0,5	5	11,5	20	33,1	76,4	19,2	28,1	16
	Controle	56	0,2	5,9	13,8	21,4	30,9	81	20,1	25	12
	p = 0,59	Geral	195	0,2	5,7	12,5	20	30,3	81	18,4	24,6
IL-10_SE	Caso	62	0,5	16,9	35	59,1	84,6	226,6	56,8	67,6	15
	Contato	74	0,7	15,3	26,4	52,9	66,8	224,9	56,3	51,5	19
	Controle	54	5,8	19,5	30	45,5	63,6	208,5	40,2	44,1	14
	p = 0,52	Geral	190	0,5	16,7	32,2	52,8	72,1	226,6	52,4	55,4
IL-10_ML	Caso	61	0,3	21,3	43,6	57,6	95,8	177,6	48,5	74,5	16
	Contato	80	1,2	15,6	33,8	54,9	90	186	54,2	74,4	13
	Controle	59	2,6	19	42,4	47,1	75,1	137,5	34,3	56	9
	p = 0,90	Geral	200	0,3	16,5	36,9	53,4	80,3	186	47,3	63,8
IFN γ _SE	Caso	56	2,1	93,7	355,9	580,9	843,1	2774	676,7	749,3	21
	Contato	63	2,1	179,5	331,7	857,8	1443,1	3984,1	998	1263,6	30
	Controle	42	6,9	120	385	695,2	929,5	3363,5	811,3	809,6	26
	p = 0,74	Geral	161	2,1	136,8	343,1	719,1	952,8	3984,1	852,3	815,9
IFN γ _ML	Caso	54	2,1	152,3	366,8	573,5	774,8	2888,2	644,3	622,5	23
	Contato	64	2,1	135	350,4	668,8	1147,1	3017	725,9	1012,1	29
	Controle	46	6,9	172,2	330,7	638,2	923,7	3237,2	687,7	751,4	22
	p = 0,95	Geral	164	2,1	148,1	361,5	628,9	920,3	3237,2	686,2	772,2

n = quantidade de participantes; *Min* e *Max* = menor e maior valores observados; *q1* e *q3* = primeiro e terceiro quartis; *s* = desvio padrão; *IIQ* = intervalo interquartilico (*q3* - *q1*); #NA = quantidade de dados faltantes; *p* = probabilidade de significância do teste de Kruskal-Wallis.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Tabela 6 – Caracterização da amostra em razão das quimiocinas analisadas no presente estudo.

Variável	Grupo	n	Min	q1	Mediana	Média	q3	Max	s	IIQ	#NA
IP-10_SE	Caso	62	5,1	426,1	1322,9	1665,6	2448	5527,3	1464	2021,9	15
	Contato	68	5,1	390,4	834,7	1454,4	1924	6855,3	1626,7	1533,6	25
	Controle	58	47,1	388,3	818,1	1435	2177	5257,2	1389,6	1788,6	10
	Geral	188	5,1	390,4	984,2	1518	2231,1	6855,3	1498,9	1840,8	50
p = 0,97											
IP-10_ML	Caso	61	2,7	666,8	1279,2	1777,7	2638,3	6324,7	1571,7	1971,5	16
	Contato	69	5,1	367,6	761,3	1588,6	2016,3	6806,3	1836,9	1648,7	24
	Controle	59	5,1	358,2	830,3	1393,8	2108,5	7678,1	1481,7	1750,3	9
	Geral	189	2,7	427,2	954,2	1588,8	2135,8	7678,1	1646,1	1708,5	49
p = 0,21											
MIG_SE	Caso	61	2,6	252,9	1171,3	1844,2	2639	8448,9	2040,9	2386,1	16
	Contato	63	4,4	115,6	394,7	1307,5	1774,9	8932,1	2025,1	1659,3	30
	Controle	57	1	131,8	476,7	1613,3	2632	8873,8	2213,4	2500,2	11
	Geral	181	1	144,8	592,5	1584,7	2184,1	8932,1	2091,7	2039,3	57
p = 0,48											
MIG_ML	Caso	60	11,9	472,6	1406,3	2329,7	3356,6	8835,2	2488,6	2884,1	17
	Contato	62	8,8	113,6	232,2	1592,2	1769,5	10307,8	2599,8	1655,9	31
	Controle	59	1	136	418,9	1346,3	1848,8	9805,7	1965,3	1712,8	9
	Geral	181	1	161,4	630,5	1756,5	2163,7	10307,8	2395,6	2002,3	57
p = 0,19											
IL-8_SE	Caso	71	29,8	3960,8	8068,6	8800,3	12950,9	20958,8	5771,3	8990,1	6
	Contato	84	174	2780,5	5382,2	6204,8	8095	21178,9	4393,9	5314,5	9
	Controle	64	726,1	4045,4	6207,9	7247,8	10357,2	20834,7	4587,6	6311,8	4
	Geral	219	29,8	3536,7	6185,9	7351,1	10341,6	21178,9	5032	6804,9	19
p = 0,03											
IL-8_ML	Caso	72	10,8	3951,9	6815,6	7444,5	11157,3	16727,8	4579,3	7205,4	5
	Contato	84	186,6	2381,4	3931,4	5113,6	6977,3	17717,1	3558,7	4595,8	9
	Controle	62	1034,7	3396	5509,8	6200,4	8576,6	15570,2	3673,7	5180,7	6
	Geral	218	10,8	3082,2	5337,5	6192,5	8464,3	17717,1	4058,3	5382,1	20
p = 0,0025											
MCP-1_SE	Caso	72	4,8	2730,9	3636,8	3309,1	4146,2	5693,6	1444,1	1415,3	5
	Contato	85	17,9	2222,7	3481	3021,2	4014,5	6341	1410,1	1791,8	8
	Controle	68	172,3	2759,5	3705	3528	4255,8	6645,4	1515,8	1496,3	0
	Geral	225	4,8	2424,9	3615,8	3266,5	4153,1	6645,4	1462,2	1728,2	13
p = 0,14											
MCP-1_ML	Caso	69	270,9	3011	3658	3464,3	4166,9	6150,7	1309,8	1155,8	8
	Contato	79	313,8	2587,6	3228,2	3162,7	3933,9	6355,3	1236,7	1346,4	14
	Controle	66	506,8	2529	3713,8	3343,8	4170	6137	1271,9	1641	2
	Geral	214	270,9	2774,3	3525,6	3315,8	4098,6	6355,3	1271,8	1324,3	24
p = 0,03											
RANTES_SE	Caso	70	25,7	141,8	342,5	809,2	898,3	4709,4	1092,8	756,5	7
	Contato	82	38,4	318,7	885,1	1513,5	2404,2	5055,4	1468,5	2085,5	11
	Controle	66	26,4	264,2	824,3	1372,1	2320,3	4568,6	1372,3	2056,1	2
	Geral	218	25,7	244,6	599,1	1244,5	1901,5	5055,4	1357,3	1656,9	20
p = 0,00091											
RANTES_ML	Caso	71	25,4	168,3	360	874,7	762,7	5372,1	1293,7	594,3	6
	Contato	78	34,5	333,3	887,5	1485,2	2331,4	5005,9	1384,7	1998,1	15
	Controle	66	35,8	211,9	725,4	1406,1	2029	5289,9	1402,8	1817,1	2
	Geral	215	25,4	229,3	559,5	1259,3	1922,2	5372,1	1381,8	1692,9	23
p = 0,0004											

n = quantidade de participantes; *Min* e *Max* = menor e maior valores observados; *q1* e *q3* = primeiro e terceiro quartis; *s* = desvio padrão; *IIQ* = intervalo interquartilico ($q3 - q1$); #NA = quantidade de dados faltantes; *p* = probabilidade de significância do teste de Kruskal-Wallis.

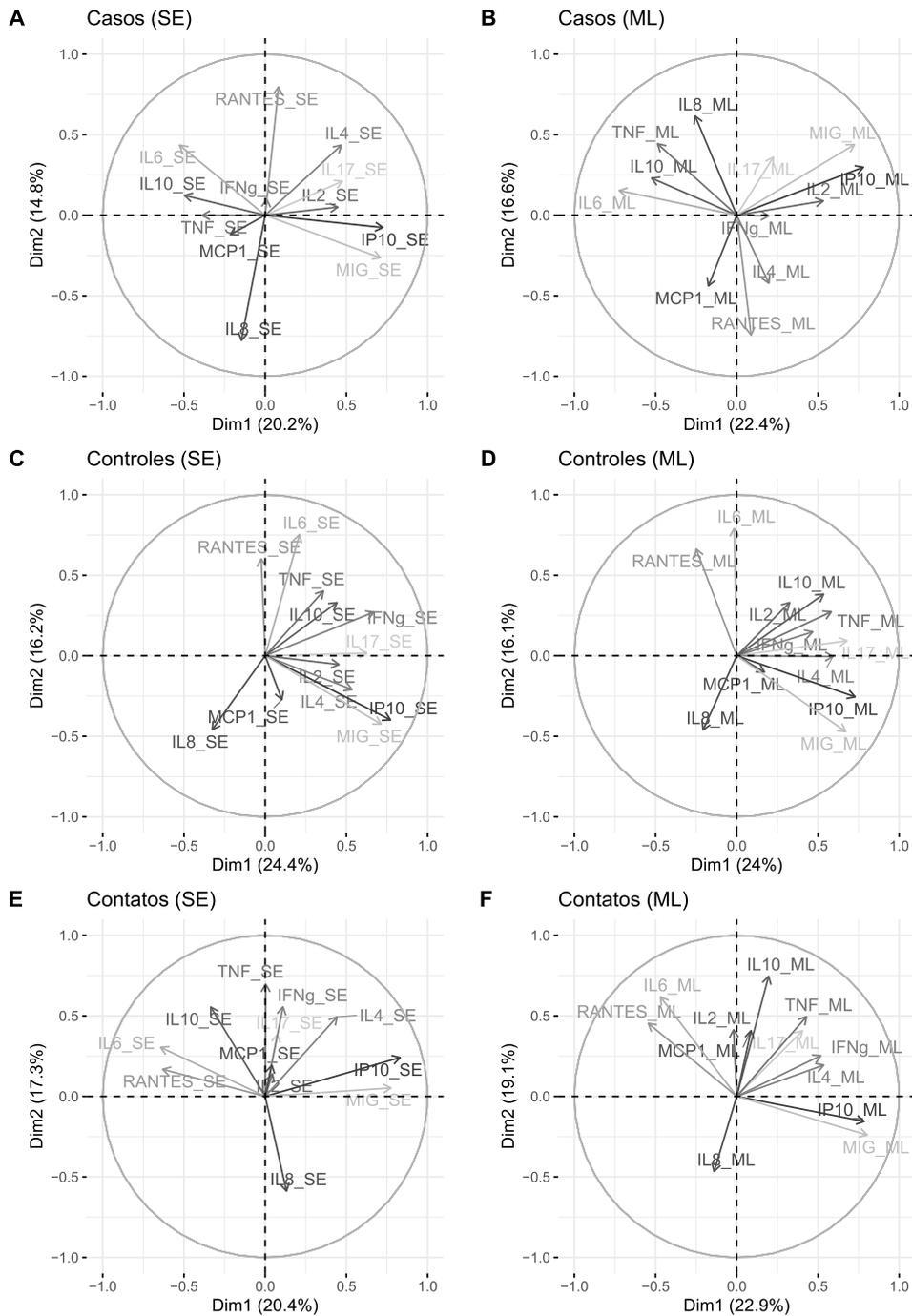
Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Na aplicação da ACP, consideramos adequada a separação desses perfis em função dos grupos: casos, controles e contatos. Os dois primeiros grupos denotam respectivamente os indivíduos doentes e os controles, enquanto que o último grupo representa os indivíduos chamados contatos: aqueles supostamente não contaminados que conviviam prolongadamente com pelo menos um indivíduo portador de hanseníase.

A Figura 9 apresenta os diferentes perfis de produção de citocinas e quimiocinas das culturas de PMBC dos indivíduos participantes do estudo em duas abordagens independentes: sem estímulo (SE); e com estímulo específico do *M. leprae* (ML). Para fins de interpretação, é importante enfatizar algumas propriedades da solução gerada pela ACP onde os vetores (setas) denotam as representações das variáveis apontando no sentido da maior produção da respectiva citocina ou quimiocina representada pelo vetor. Além disso, o tamanho do vetor denota a importância (peso) da respectiva variável na solução da ACP de forma que vetores maiores representam as citocinas ou quimiocinas que tem maior impacto na configuração do espaço reduzido.

Essa representação dos componentes principais demonstra ainda o quanto que as variáveis são mutuamente correlacionadas e pode revelar até mesmo redundância das mesmas. Quanto mais sobrepostos os vetores, maior a correlação positiva entre os respectivos biomarcadores enquanto que vetores apontando para lados opostos denotam correlações negativas. Em termos trigonométricos, analisando os vetores dois a dois, podemos especificar ainda que: o ângulo de 0° representa uma perfeita correlação positiva ($\rho = +1$); o ângulo de 180° representa uma perfeita correlação negativa ($\rho = -1$); e o ângulo de 90° representa ausência de correlação ($\rho = 0$). Ou seja, de forma geral, a correlação (ρ) entre duas variáveis representadas no espaço reduzido da ACP é igual ao cosseno (cos) do ângulo (θ) formado por seus respectivos vetores. Percebemos, na Figura 9, uma diferença entre casos e controles em relação à produção de citocinas e quimiocinas, nas culturas com e sem estímulo. Esses resultados estão aqui descritos considerando o plano cartesiano, em sentido anti-horário, em seu primeiro quadrante, seguido do segundo, terceiro e finalmente o quarto quadrante.

Figura 9 – Análises de Componentes Principais nas culturas de PBMC, considerando os grupos de estudo.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021), onde: SE - cultura sem estímulo; ML - cultura com estímulo específico pelo *M. leprae*.

Nos indivíduos acometidos pela doença (casos), percebemos que a produção da citocina IL-4, concomitantemente com a produção das quimiocinas IP-10, MIG, IL-8 e RANTES, é afetada pelo estímulo específico do *M. leprae* pois os vetores que representam esses biomarcadores mudam de quadrante ao comparamos a Figura 9B com a Figura 9A. Importante notar a mudança que ocorreu nas quimiocinas IL-8 e RANTES as quais praticamente apresentaram uma rotação de 180° em seus vetores nas culturas estimuladas pelo ML, especificamente no grupo dos casos. Ainda analisando os indivíduos portadores da doença, percebemos que algumas correlações também sofreram mudanças em função do estímulo: a IL-17 passa a ser mais correlacionada com a MIG e IP-10 do que com a IL-4 e IL-2 como observado no perfil sem estímulo; a correlação positiva entre IL-2 e IL-4, sem estímulo, se torna praticamente nula (ângulo de 90°) no perfil com estímulo; a moderada correlação negativa entre MCP-1 e RANTES, sem estímulo, se torna forte e positiva no perfil com estímulo (o mesmo ocorre entre IL-17 e IL-8); o TNF e a IL-8 que tem correlação praticamente nula, sem estímulo, passam a forte e positivamente correlacionadas no perfil com estímulo; a extremamente forte correlação negativa entre a IL-4 e a MCP-1, sem estímulo, passa a ser forte e positiva no perfil com estímulo específico.

Nos indivíduos controles percebemos pouca mudança no perfil imunológico com estímulo específico em relação ao perfil sem estímulo. Uma citocina que nos chama atenção nesse grupo é a IL-2 que no perfil com estímulo (Figura 9D) se correlaciona mais com a IL-10 do que com a IL-17 como observado no perfil sem estímulo (Figura 9C). Os indivíduos supostamente não contaminados por *M. leprae* que convivem de forma prolongada com pelo menos um portador de hanseníase (contatos, Figura 9E e Figura 9F) apresentaram um perfil de produção de citocinas e quimiocinas aparentemente compartilhado com o perfil dos controles e dos casos. Inclusive, a ACP no grupo dos contatos sugere que a correlação entre IL-8 e MCP-1 se assemelha mais ao perfil dos casos (com estímulo) que dos controles.

Ao contrastarmos o grupo dos Casos e o grupo dos Controles pela abordagem multivariada de ACP nas culturas estimuladas pelo *M. leprae*, percebemos que os indivíduos acometidos pela hanseníase tenderam a apresentar uma forte e positiva correlação entre IL-8 e TNF, justamente o contrário do observado no grupo dos Controles que apresentaram forte e negativa correlação entre esses marcadores (Figuras 9B e D). De forma muito similar, essa dinâmica ocorre nas correlações entre MCP-1 e RANTES, e também nas correlações entre IL-4 e RANTES. Porém, seguindo a mesma linha de raciocínio, percebemos que os indivíduos portadores de hanseníase tenderam a apresentar uma forte e negativa correlação entre IFN e TNF, ao passo que o grupo dos Controles apresentou forte e positiva correlação entre esses marcadores. Novamente, de forma muito similar, essa dinâmica ocorre nas correlações entre: MCP-1 e IL-17; IL-10 e IL-2; TNF e IL-2; TNF e IFN; TNF e IL-4; IL-10 e IL-4.

4.3 ASPECTOS MOLECULARES

A Tabela 7 mostra a relação dos genes, SNPs e respectivos genótipos nos grupos Caso, Controle e Contatos. Esta tabela descreve o perfil genético da amostra de estudo considerando os marcadores moleculares selecionados para analisar sua associação com a hanseníase. Avaliamos SNPs nos genes *TLR4* (rs4986790, rs2149356, rs1927914 e rs2737190), *IL-10* (rs1554286, rs3024490, rs1800872 e rs1800871), *TLR1* (rs4833095), *TLR2* (rs3804099) e *SLC11A1* (rs17235416) principalmente a fim de encontrar diferenças entre os casos e os controles. Uma vez definidos os padrões moleculares, o acompanhamento dos contatos seria melhor direcionado.

Tabela 7 – Caracterização da amostra em razão das variáveis genéticas adotadas no estudo.

Gene	SNP	Genótipo	Caso (77)		Contato (93)		Controle (68)		Total (238)	
			n	%	n	%	n	%	n	%
IL-10	rs1554286	A/A	9	11,7	12	12,9	10	14,7	31	13
		G/A	36	46,8	40	43	32	47,1	108	45,4
		G/G	32	41,6	41	44,1	26	38,2	99	41,6
IL-10	rs1800871	A/A	12	15,6	17	18,3	12	17,6	41	17,2
		A/G	38	49,4	38	40,9	32	47,1	108	45,4
		G/G	27	35,1	38	40,9	24	35,3	89	37,4
IL-10	rs1800872	G/G	28	36,4	38	40,9	23	33,8	89	37,4
		T/G	36	46,8	39	41,9	32	47,1	107	45
		T/T	13	16,9	16	17,2	13	19,1	42	17,6
IL-10	rs3024490	A/A	12	15,6	17	18,5	11	16,4	40	16,9
		A/C	38	49,4	38	41,3	33	49,2	109	46,2
		C/C	27	35,1	37	40,2	23	34,3	87	36,9
SLC11A1	rs17235416	del/del	1	1,3	0	0	1	1,5	2	0,8
		TGTG/del	13	16,9	17	18,3	9	13,2	39	16,4
		TGTG/TGTG	63	81,8	76	81,7	58	85,3	197	82,8
TLR1	rs4833095	C/C	26	33,8	25	26,9	23	33,8	74	31,1
		C/T	36	46,8	50	53,8	32	47,1	118	49,6
		T/T	15	19,5	18	19,4	13	19,1	46	19,3
TLR2	rs3804099	C/C	23	29,9	24	25,8	18	26,5	65	27,3
		C/T	36	46,8	54	58,1	36	52,9	126	52,9
		T/T	18	23,4	15	16,1	14	20,6	47	19,8
TLR4	rs4986790	A/A	71	92,2	87	93,5	68	100	226	95
		A/G	6	7,8	6	6,4	0	0	12	5
TLR4	rs1927914	A/A	18	23,4	27	29	28	41,2	73	30,7
		A/G	37	48	56	60,2	27	39,7	120	50,4
		G/G	22	28,6	10	10,8	13	19,1	45	18,9
TLR4	rs2149356	G/G	19	24,7	27	29	27	39,7	73	30,7
		G/T	36	46,8	56	60,2	28	41,2	120	50,4
		T/T	22	28,6	10	10,8	13	19,1	45	18,9
TLR4	rs2737190	A/A	18	23,4	27	29	28	41,2	73	30,7
		A/G	37	48	56	60,2	27	39,7	120	50,4
		G/G	22	28,6	10	10,8	13	19,1	45	18,9

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

A partir das frequências genotípicas apresentadas na Tabela 7, aplicamos o teste HWChisq (94), disponível no R, a fim de avaliar alguma desproporção quanto ao que seria esperado naturalmente pelos genótipos. Nesse teste, a hipótese nula é que os genótipos estejam em equilíbrio *Hardy-Weinberg*. Partindo da hipótese básica (H_0 , *nula*) de que os genótipos estejam em equilíbrio, realizou-se o teste χ^2 (114) onde não rejeitamos ($p > 0,05$), em todos os SNPs, a hipótese de que estejam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

A Tabela 8 apresenta a menor frequência alélica dos SNPs avaliados. Na população estudada, as frequências dos alelos dos SNPs ficaram muito próximas a de outras populações nos estudos do projeto *1000 Genomes* ou *TOPMED*, exceto a frequência do SNP rs4986790 que, na nossa população foi três vezes menor ao MAF global.

Tabela 8 – Avaliação das proporções dos genótipos de cada SNP analisado no presente estudo.

Gene/Alelo	SNP	MAF(e)	MAF(r)
IL-10/A	rs1554286	0,357	0,408
IL-10/A	rs1800871	0,399	0,435
IL-10/T	rs1800872	0,401	0,435
IL-10/A	rs3024490	0,400	0,438
SLC11A1/de	rs17235416	0,090	0,090
TLR1/T	rs4833095	0,441	0,425
TLR2/T	rs3804099	0,462	0,415
TLR4/G	rs4986790	0,025	0,060
TLR4/G	rs1927914	0,441	0,490
TLR4/T	rs2149356	0,441	0,479
TLR4/G	rs2737190	0,441	0,490

SNP - Nucleotídio de Polimorfismo Único;
MAF - Menor Frequência Alélica; MAF(e) - MAF
encontrado na amostra do presente estudo;
MAFS(r) - MAF de referência das populações
avaliadas no Projeto 1000 Genomes, com exceção
do rs17235416 obtido do TOPMED; p -
probabilidade de significância do teste χ^2 .

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

As Tabelas 9, 10 e 11 apresentam como os genótipos dos participantes estão distribuídos e possibilitam avaliar as chances de adoecimento pela hanseníase em função dessas características moleculares dos indivíduos. Essas tabelas contemplam hipóteses sobre modelos alélicos de: *i* - *codominância*, no qual os alelos em heterozigose seriam ativos e independentes entre si; *ii* - *dominância*, no qual um alelo determina um fenótipo mesmo em dose simples; *iii* - *recessividade*, no qual um alelo determina um fenótipo apenas em dose dupla; e *iv* - *sobredominância*, no qual apenas os alelos em heterozigose determinam um fenótipo. As variantes rs1927914 (c) e rs2737190 (d) apresentaram altíssimo desequilíbrio de ligação de forma que os resultados foram idênticos para nossa amostra.

Considerando um nível de confiança de 95,0%, percebemos na Tabela 9 que apenas os SNPs rs1927914 (c) e rs2737190 (d) do gene *TLR4*, que estão em alto desequilíbrio de ligação, apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação as razões de chance dos casos e controles sob o modelo de dominância alélica (A/A vs A/G+G/G). Os indivíduos com genótipos A/G ou G/G têm aproximadamente 2,3 (1/0,44) vezes mais chances de adoecer que os indivíduos com genótipo A/A. Sendo assim, o alelo A apresenta um papel de proteção à doença no modelo de codominância proposto nesses SNPs. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos SNPs avaliados do gene IL-10 (Tabela 10) e nem com os SNPs rs4833095 de TLR1, rs3804099 de TLR2 e rs17235416 do gene SLCA11A1 (Tabela 11).

Tabela 9 – Estimativas de razão de chances considerando diferentes modelos de herança genética em relação aos SNPs rs4986790 (a), rs2149356 (b), rs1927914 (c) e rs2737190 (d) do gene *TLR4*.

SNP	Modelo	Genótipo	Caso (77)		Controle (68)		RC	li	ls	p
			n	%	n	%				
(a) rs4986790	Codominância	A/A	71	92	68	100	1	-	-	0,03
		A/G	6	7,8	0	0	0	0	0	
(b) rs2149356	Codominância	G/G	19	25	27	40	1	-	-	0,12
		G/T	36	47	28	41	0,6	0,3	1,2	
		T/T	22	29	13	19	0,4	0,2	1	
	Dominância	G/G	19	25	27	40	1	-	-	0,05
		G/T+T/T	58	75	41	60	0,5	0,2	1	
	Recessividade	G/G+G/T	55	71	55	81	1	-	-	0,18
		T/T	22	29	13	19	0,6	0,3	1,3	
	Sobredominância	G/G+T/T	41	53	40	59	1	-	-	0,50
G/T		36	47	28	41	0,8	0,4	1,5		
(c) rs1927914	Codominância	A/A	18	23	28	41	1	-	-	0,06
		A/G	37	48	27	40	0,5	0,2	1	
		G/G	22	29	13	19	0,4	0,2	0,9	
	Dominância	A/A	18	23	28	41	1	-	-	0,02
		A/G+G/G	59	77	40	59	0,4	0,2	0,9	
	Recessividade	A/A+A/G	55	71	55	81	1	-	-	0,18
		G/G	22	29	13	19	0,6	0,3	1,3	
	Sobredominância	A/A+G/G	40	52	41	60	1	-	-	0,31
A/G		37	48	27	40	0,7	0,4	1,4		
(d) rs2737190	Codominância	A/A	18	23	28	41	1	-	-	0,06
		A/G	37	48	27	40	0,5	0,2	1	
		G/G	22	29	13	19	0,4	0,2	0,9	
	Dominância	A/A	18	23	28	41	1	-	-	0,02
		A/G+G/G	59	77	40	59	0,4	0,2	0,9	
	Recessividade	A/A+A/G	55	71	55	81	1	-	-	0,18
		G/G	22	29	13	19	0,6	0,3	1,3	
	Sobredominância	A/A+G/G	40	52	41	60	1	-	-	0,31
A/G		37	48	27	40	0,7	0,4	1,4		

RC - razão de chances; li - limite inferior; ls - limite superior; p - probabilidade de significância do teste exato de Fisher.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Tabela 10 – Estimativas de razão de chances considerando diferentes modelos de herança genética em relação aos SNPs rs1554286 (a), rs3024490 (b), rs1800872 (c) e rs1800871 (d) do gene *IL-10*.

SNP	Modelo	Genótipo	Caso (77)		Controle (68)		RC	li	ls	p
			n	%	n	%				
(a) rs1554286	Codominância	G/G	32	42	26	38	1	-	-	0,84
		G/A	36	47	32	47	1,1	0,5	2,2	
		A/A	9	12	10	15	1,4	0,5	3,9	
	Dominância	G/G	32	42	26	38	1	-	-	0,68
		G/A+A/A	45	58	42	62	1,2	0,6	2,2	
	Recessividade	G/G+G/A	68	88	58	85	1	-	-	0,59
		A/A	9	12	10	15	1,3	0,5	3,4	
	Sobredominância	G/G+A/A	41	53	36	53	1	-	-	0,97
G/A		36	47	32	47	1	0,5	2		
(b) rs3024490	Codominância	C/C	27	35	23	34	1	-	-	0,99
		A/C	38	49	33	49	1	0,5	2,1	
		A/A	12	16	11	16	1,1	0,4	2,9	
	Dominância	C/C	27	35	23	34	1	-	-	0,93
		A/C+A/A	50	65	44	66	1	0,5	2,1	
	Recessividade	C/C+A/C	65	84	56	84	1	-	-	0,89
		A/A	12	16	11	16	1,1	0,4	2,6	
	Sobredominância	C/C+A/A	39	51	34	51	1	-	-	0,99
A/C		38	49	33	49	1	0,5	1,9		
(c) rs1800872	Codominância	G/G	28	36	23	34	1	-	-	0,92
		T/G	36	47	32	47	1,1	0,5	2,2	
		T/T	13	17	13	19	1,2	0,5	3,1	
	Dominância	G/G	28	36	23	34	1	-	-	0,75
		T/G+T/T	49	64	45	66	1,1	0,6	2,2	
	Recessividade	G/G+T/G	64	83	55	81	1	-	-	0,73
		T/T	13	17	13	19	1,2	0,5	2,7	
	Sobredominância	G/G+T/T	41	53	36	53	1	-	-	0,97
T/G		36	47	32	47	1	0,5	2		
(d) rs1800871	Codominância	G/G	27	35	24	35	1	-	-	0,94
		A/G	38	49	32	47	1	0,5	2	
		A/A	12	16	12	18	1,1	0,4	3	
	Dominância	G/G	27	35	24	35	1	-	-	0,98
		A/G+A/A	50	65	44	65	1	0,5	2	
	Recessividade	G/G+A/G	65	84	56	82	1	-	-	0,74
		A/A	12	16	12	18	1,2	0,5	2,8	
	Sobredominância	G/G+A/A	39	51	36	53	1	-	-	0,78
A/G		38	49	32	47	0,9	0,5	1,8		

RC - razão de chances; li - limite inferior; ls - limite superior; p - probabilidade de significância do teste exato de Fisher.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Tabela 11 – Estimativas de razão de chances considerando diferentes modelos de herança genética em relação aos SNPs rs4833095 (a), rs3804099 (b) e rs17235416 (c) respectivamente dos genes *TLR1*, *TLR2* e *SLCA11A1*.

SNP	Modelo	Genótipo	Caso (77)		Controle (68)		RC	li	ls	p
			n	%	n	%				
(a) rs4833095	Codominância	C/C	26	34	23	34	1	-	-	1,00
		C/T	36	47	32	47	1	0,5	2,1	
		T/T	15	20	13	19	1	0,4	2,5	
	Dominância	C/C	26	34	23	34	1	-	-	0,99
		C/T+T/T	51	66	45	66	1	0,5	2	
	Recessividade	C/C+C/T	62	81	55	81	1	-	-	0,96
		T/T	15	20	13	19	1	0,4	2,2	
	Sobredominância	C/C+T/T	41	53	36	53	1	-	-	0,97
C/T		36	47	32	47	1	0,5	2		
(b) rs3804099	Codominância	C/C	23	30	18	27	1	-	-	0,76
		C/T	36	47	36	53	1,3	0,6	2,8	
		T/T	18	23	14	21	1	0,4	2,5	
	Dominância	C/C	23	30	18	27	1	-	-	0,65
		C/T+T/T	54	70	50	74	1,2	0,6	2,5	
	Recessividade	C/C+C/T	59	77	54	79	1	-	-	0,69
		T/T	18	23	14	21	0,9	0,4	1,9	
	Sobredominância	C/C+T/T	41	53	32	47	1	-	-	0,46
C/T		36	47	36	53	1,3	0,7	2,5		
(c) rs17235416	Codominância	TGTG/TG	63	82	58	85	1	-	-	0,83
		TGTG/del	13	17	9	13	0,8	0,3	1,9	
		del/del	1	1,3	1	1,5	1,1	0,1	18	
	Dominância	TGTG/TG	63	82	58	85	1	-	-	0,57
		TGTG/del	14	18	10	15	0,8	0,3	1,9	
	Recessividade	TGTG/TG	76	99	67	99	1	-	-	0,93
		del/del	1	1,3	1	1,5	1,1	0,1	18	
	Sobredominância	TGTG/TG	64	83	59	87	1	-	-	0,54
TGTG/del		13	17	9	13	0,8	0,3	1,9		

RC - razão de chances; li - limite inferior; ls - limite superior; p - probabilidade de significância do teste exato de Fisher.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

4.3.1 Imunogenética

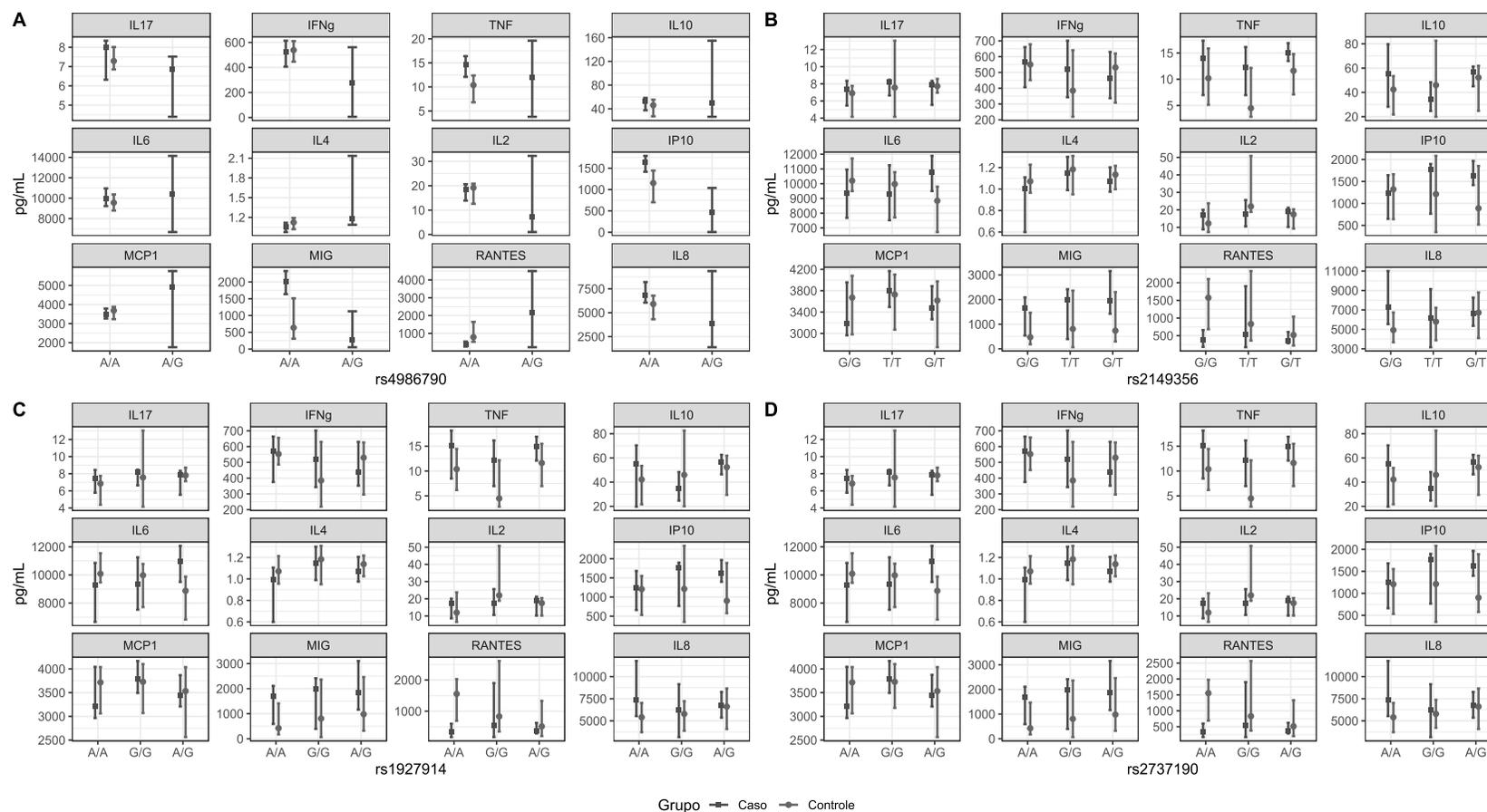
As Figuras 10, 11 e 12 apresentam as distribuições das citocinas em relação aos genótipos analisados nos grupos casos e controles via intervalos de confiança *bootstrap* de 95,0%. Percebemos algumas diferenças entre as medianas da produção de citocinas e quimiocinas entre os grupos em diferentes genótipos.

Na Figura 10, em relação ao gene TLR4, percebemos: em **A**, maior produção de MIG no grupo dos casos que no grupo dos controles com genótipo A/A no SNP rs4986790; em **B**, nenhuma diferença significativa entre casos e controles, considerando o SNP rs2149356; em **C** e em **D**, maior produção de RANTES no grupo dos controles que no grupo dos casos com genótipo A/A nos SNPs rs1927914 e rs2737190.

Na Figura 11, em relação ao gene IL-10, percebemos: em **A**, maior produção de TNF no grupo dos casos que no grupo dos controles com genótipo G/A do SNP rs1554286; em **B**, maior produção de TNF no grupo dos casos que no grupo dos controles com genótipo A/C no SNP rs3024490; em **C**, maior produção de TNF no grupo dos casos que no grupo dos controles com genótipo T/G, bem como maior produção de IL-4 no grupo dos controles que no grupo dos casos com genótipo T/T no SNP rs1800872; em **D**, maior produção de TNF no grupo dos casos que no grupo dos controles com genótipo A/G no SNP rs1800871.

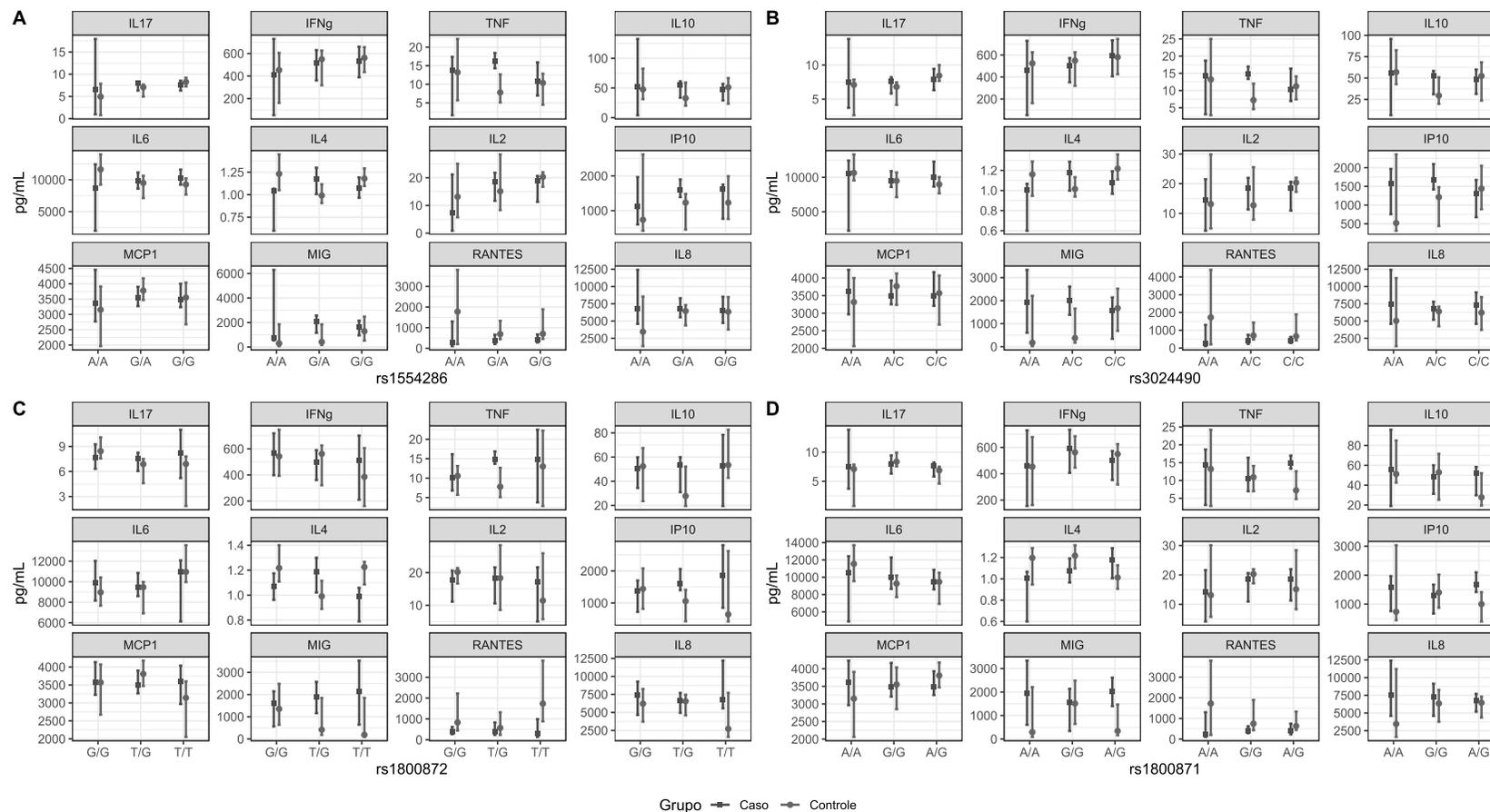
Na Figura 12, em relação aos genes TLR1, TLR2 e SLC11A1, percebemos respectivamente: em **A**, nenhuma diferença significativa entre casos e controles, considerando o SNP rs4833095; em **B**, maior produção de TNF no grupo dos casos que no grupo dos controles com genótipo C/C, bem como maior produção de IP-10 e MIG no grupo dos casos que no grupo dos controles com genótipo C/T no SNP rs3804099; em **C**, nenhuma diferença significativa entre casos e controles, considerando o SNP rs17235416.

Figura 10 – Perfil da produção de citocinas e quimiocinas dos casos e controles em função dos genótipos dos SNPs rs4986790 (A), rs2149356 (B), rs1927914 (C) e rs2737190 (D) do gene *TLR4*.



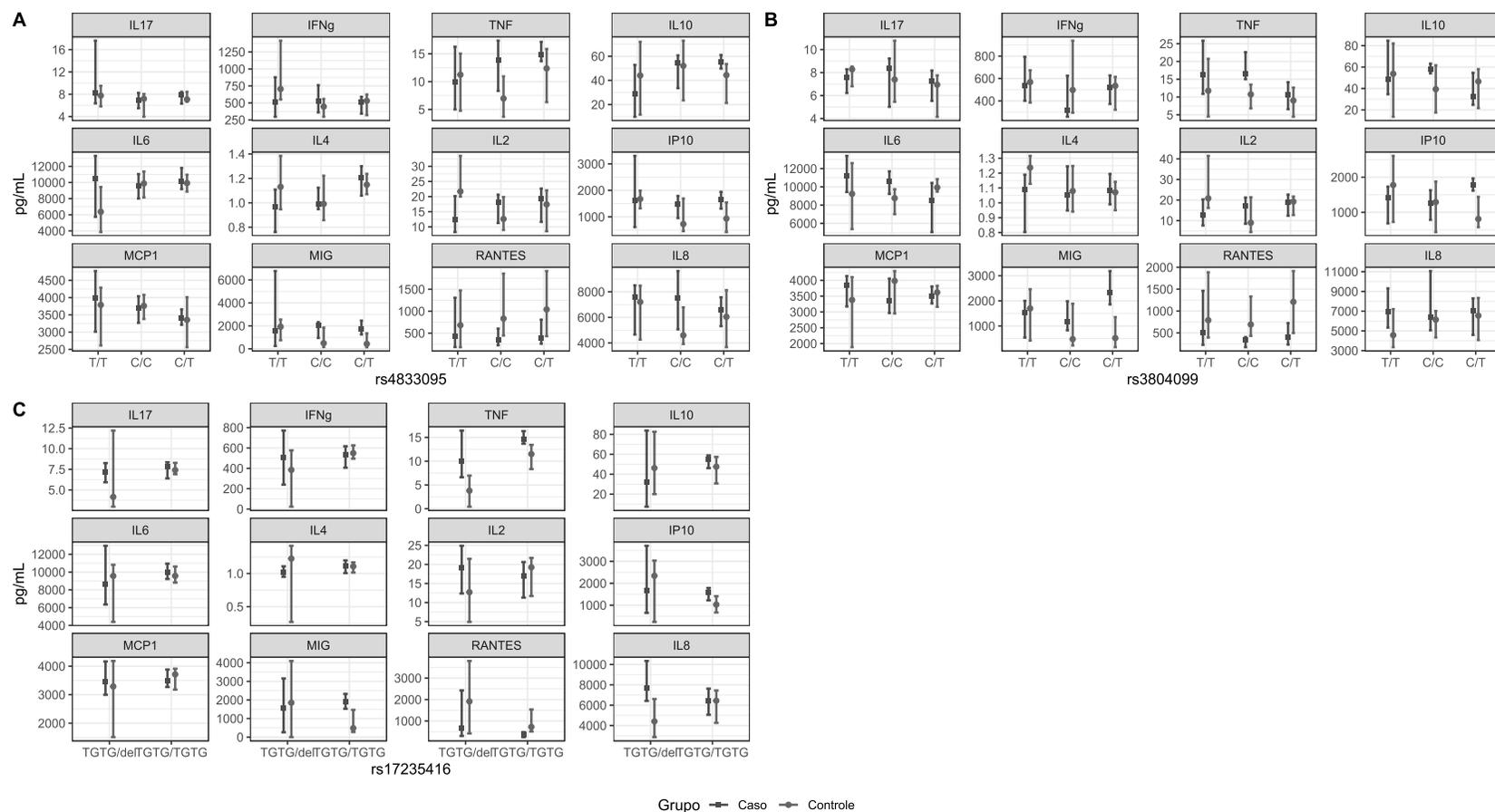
Fonte: Elaborada pelo autor (2021), sendo que o ponto central, limite inferior e limite superior dos intervalos de confiança representam, respectivamente, os percentis 2,5, 50 e 97,5 das 10.000 amostras de *bootstrap* criadas para esse estudo. Considere IFN γ = IFN- γ .

Figura 11 – Perfil da produção de citocinas dos casos e controles em função dos genótipos dos SNPs rs1554286 (A), rs3024490 (B), rs1800872 (C) e rs1800871 (D) do gene *IL-10*.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021), sendo que o ponto central, limite inferior e limite superior dos intervalos de confiança representam, respectivamente, os percentis 2,5, 50 e 97,5 das 10.000 amostras de *bootstrap* criadas para esse estudo. Considere IFN γ = IFN- γ .

Figura 12 – Perfil da produção de citocinas dos casos e controles em função dos genótipos dos SNPs *rs4833095* (A), *rs3804099* (B) e *rs17235416* (C) dos genes *TLR1*, *TLR2* e *SLC11A1*, respectivamente.

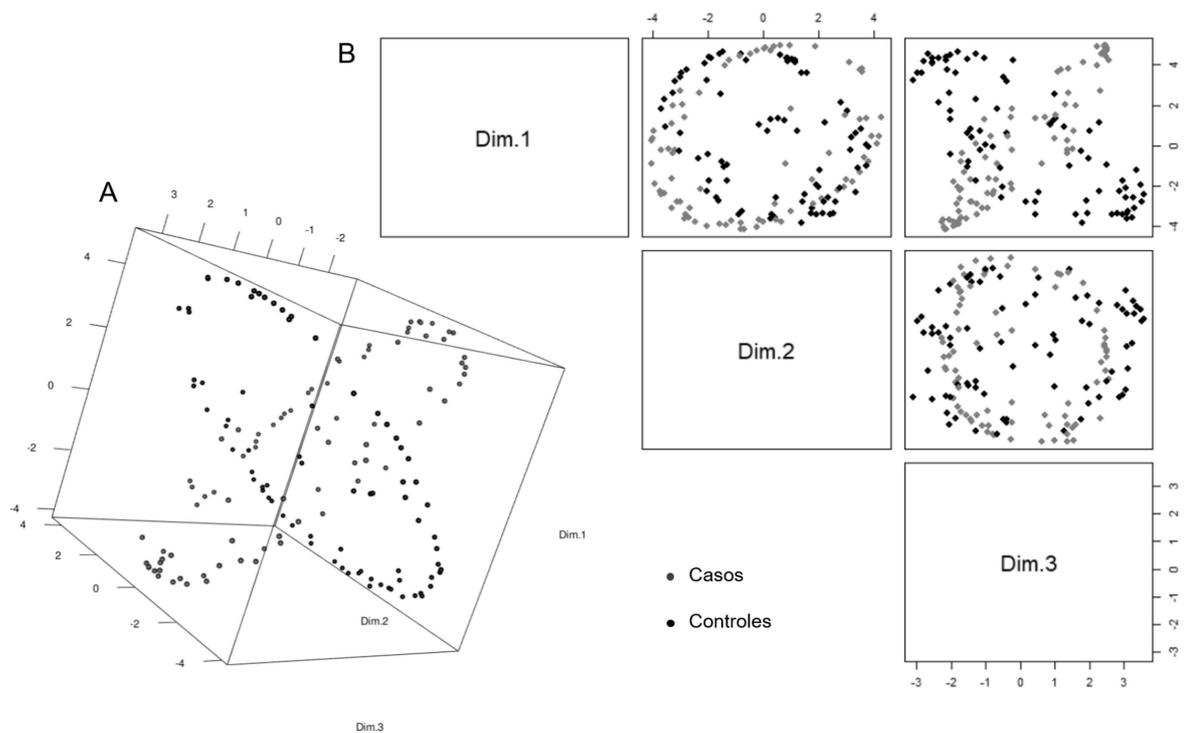


Fonte: Elaborada pelo autor (2021), sendo que o ponto central, limite inferior e limite superior dos intervalos de confiança representam, respectivamente, os percentis 2,5, 50 e 97,5 das 10.000 amostras de *bootstrap* criadas para esse estudo. Considere IFN γ = IFN- γ .

4.4 ALGORITMO DA SUSCETIBILIDADE E EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS CONTATOS INTRA-DOMICILIARES

Para fins de modelagem em IA, realizamos a classificação dos indivíduos em casos ou controles. Uma vez que o modelo foi treinado, fizemos a predição dos contatos intradomiciliares dos respectivos casos para que os mesmos sejam posteriormente acompanhados ao longo dos anos pela equipe de pesquisa e demais órgãos de saúde pública que colaboram com o projeto a fim de controlar a transmissão da doença. A Figura 13 apresenta a nova configuração dos dados após o tratamento. Na etapa de modelagem, utilizamos cinco dimensões desse novo espaço reduzido.

Figura 13 – Representação tridimensional (A) dos dados preparados para a etapa de modelagem por inteligência artificial e suas projeções nos planos bidimensionais (B).

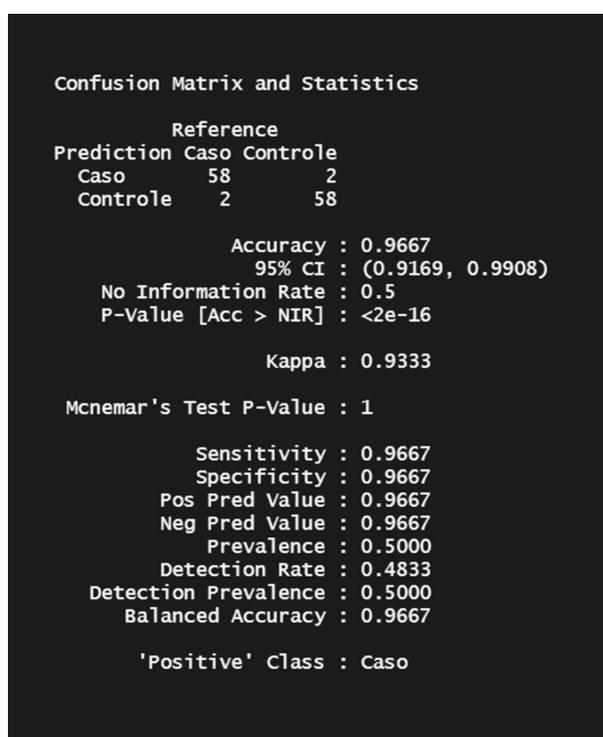


Fonte: Elaborada pelo autor (2021), sendo que os casos estão em vermelhos e os controles em preto.

A partir dessa nova estrutura dos dados apresentada na Figura 13, aplicamos algoritmo *Random Forest* a fim de criar um modelo de classificação binária: controles *vs* doentes. O modelo foi treinado com os parâmetros padrões apresentados na biblioteca `randomForest` do R cujas principais estatísticas são apresentadas na Figura 14. Considerando todos os 158 indivíduos (casos e controles), o modelo errou a predição em apenas quatro deles.

Na Figura 14 são apresentados ainda parâmetros de qualidade dos modelos de predição de forma que: *acurácia* denota o percentual de acerto do modelo, na predição tanto de doentes quanto de controles; *precisão* denota o percentual de acerto do modelo, dentre apenas os que tiveram predição de doentes; *sensibilidade* denota o percentual de acerto do modelo, dentre os sabidamente doentes; *especificidade* denota o percentual de acerto do modelo, dentre os indivíduos supostamente não contaminados pelo *M. leprae* (controles); *VPP*, valor de predição positiva, denota a probabilidade de um indivíduo realmente estar doente, dado que o modelo tenha predito isto; *VPN*, valor de predição negativa, denota a probabilidade de um indivíduo realmente não estar contaminado pelo *M. leprae*, dado que o modelo tenha predito isto.

Figura 14 – Estatísticas acerca da qualidade do modelo RF.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021) a partir da função `confusionMatrix` do pacote `caret` do *software R*.

A Tabela 12 revela uma matriz que replica uma das 500 árvores de decisão contidas na *Random Forest* que aplicamos, a qual apresentou 3,4% de erro de predição. Essa Tabela ilustra o método de classificação utilizado em todas as outras árvores de decisão do modelo adotado.

Dadas as cinco dimensões de um paciente no plano cartesiano criado pela aplicação da PCA (ver Figura 13), seguimos a lógica: *i.* começando pelo “Ramo 1” (primeira linha da tabela), observamos a coordenada do paciente na quarta dimensão (Dim.4); *ii.* caso essa coordenada seja menor ou igual ao ponto de corte “2.10226” partimos para o “Ramo Esquerdo” 2 (segunda linha da tabela) ou para o “Ramo Direito” 3 (terceira linha), caso contrário. *iii.* segue-se esse direcionamento percorrendo os ramos (linhas da tabela) até que na coluna “*Status*” seja encontrado o valor “-1,00”, indicando a conclusão da predição nessa árvore de decisão. Lembramos que essa série de procedimentos é realizada ao longo de toda a *random Forest* e que a decisão final denota o consenso entre elas, emulando uma junta médica ao analisar os parâmetros do paciente frente a uma possível infecção por *M. leprae*.

Tabela 12 – Árvore de decisão com erro de inferência de 3,4%.

Ramo	Esquerdo	Direito	Variável	Corte	Status	Predição
1	2	3	Dim.4	2,10	1	
2	4	5	Dim.1	2,05	1	
3	-	-	-	-	-1	Caso
4	6	7	Dim.3	1,56	1	
5	8	9	Dim.3	1,04	1	
6	10	11	Dim.5	-3,63	1	
7	-	-	-	-	-1	Caso
8	-	-	-	-	-1	Caso
9	-	-	-	-	-1	Controle
10	-	-	-	-	-1	Caso
11	-	-	-	-	-1	Controle

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Em sentido horário, podemos separar o grupo dos contatos em ordem de prioridade no acompanhamento a fim de diminuir a transmissão da doença nas comunidades estudadas. Percebemos que os participantes ‘1194’ e ‘1196’ careceriam de acompanhamento mais frequente que os participantes ‘1219’ e ‘1136’.

Esses participantes de maior risco de evoluírem para formas clínicas da hanseníase (‘1194’ e ‘1196’) trataram-se de duas adolescentes de área urbana, de pele parda/preta, de 13 e 16 anos de idade, contatos de pacientes multibacilares. Ambas residiam com cinco ou mais pessoas, apresentavam cicatriz de BCG e praticamente nenhuma característica clínica da doença, com exceção de um único espessamento neural em uma delas. A mensuração de citocinas e quimiocinas na cultura de células estimuladas (*M. leprae*), comparada a cultura sem estímulo, foi menor para IL-17, IFN-g, TNF, RANTES e IL-8. Entretanto, foi maior para IL-6, IL-4, IP-10 e MCP-1. Quanto às variáveis genéticas, apesar dessas não terem feito parte do modelo de predição em questão, verificou-se que as adolescentes apresentaram o mesmo genótipo em 4 dos 11 SNPs analisados: G/A no rs1554286 (IL-10); A/A no rs4986790 (TLR-4); C/T no rs4833095 (TLR-1); e C/T no rs3804099 (TLR-2). Especificamente nas variantes em que foi demonstrada associação estatisticamente significativa quanto à hanseníase, essas adolescentes apresentaram genótipos A/A e A/G nos SNPs rs1927914 e rs2737190 do gene *TLR4*. Dessa forma, apenas a ‘1196’ apresentou o alelo de susceptibilidade (G) segundo o presente estudo.

Em contraste, os participantes de menor risco (‘1219’ e ‘1136’) tratavam-se de um contato feminino (28 anos, 2 cicatrizes de BCG) e um contato masculino (21 anos, 0 cicatriz de BCG), ambos de área urbana, de pele parda, residiam com cinco ou mais pessoas, sem características clínicas da doença. Na cultura estimulada do contato feminino, observaram-se igual ou menor produção de todas as citocinas e quimiocinas analisadas, em comparação com a cultura não estimulada. No contato masculino, excetuando a diminuição de MCP-1, RANTES e IL-8, todas as outras citocinas e quimiocinas tiveram suas produções aumentadas nas culturas de células com estímulo do *M. leprae*. Quanto às variáveis genéticas, verificou-se que os indivíduos apresentaram o mesmo genótipo em apenas 2 dos 11 SNPs analisados: A/A no rs4986790 (TLR-4); e C/T no rs3804099 (TLR-2).

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS CLÍNICOS, IMUNOLÓGICOS E MOLECULARES

As citocinas e quimiocinas variam bastante na espécie humana, em função de uma gama de fatores como idade, gênero, doenças crônicas, perfil genético, estado emocional e psicológico (115, 116). No que se refere especificamente a análise de citocinas e quimiocinas, existem diversos protocolos para quantificação desses marcadores, fato que aumentou o desafio de estabelecer padrões generalizados que auxiliem no diagnóstico da hanseníase. Considerando a rede de interações dessas proteínas (Figura 3), julgamos interessante um reconhecimento de padrão por meio da redução de dimensionalidade dos dados provenientes desses marcadores imunológicos (Figura 9), assim como simulações (*bootstrap*) para associar a produção de citocinas e quimiocinas aos genótipos dos participantes do estudo (Figuras 10 a 12), a fim de tentar entender um pouco mais sobre a resposta imune do hospedeiro frente a hanseníase.

Foi observado na Tabela 5 que o grupo dos casos apresentou uma mediana de produção de TNF superior na cultura de células estimuladas pelo *M. leprae* que na cultura de células sem estímulo. Estudos em PBMC apontam que essa produção aumentada de TNF está relacionada à uma reação inflamatória frente ao glicolípido-fenólico-1 (PGL-1), molécula exclusiva do *M. leprae* (117). Essa relação é observada especialmente em reações imunológicas exacerbadas contra o PGL-1, lipoarabinomanana e segmentos do esqueleto celular do bacilo. A literatura aponta que os níveis de TNF reduzem drasticamente (mais de 90%) após o início do tratamento às reações hansênicas pela ingestão de talidomida, indicando que essa citocina contribui para o processo inflamatório em resposta ao *M. leprae* (118).

O presente estudo apontou maior produção de TNF nos casos que nos controles (Figura 12B), quando analisamos a variante **rs38040099** do TLR2, especificamente nos indivíduos de genótipo C/C. Além disso, embora de forma não significativa, percebemos que indivíduos com genótipo C/T produziram mais IL-6 no grupo dos controles que nos casos ao contrário do observado nos demais genótipos do **rs3804099**. De forma análoga, a produção de IL-10 foi superior nos casos que nos controles, nos indivíduos com genótipo C/C ao contrário dos demais genótipos (Figura 12B), embora esse resultado também não tenha sido estatisticamente relevante a um nível de significância de 5%.

Esses resultados, embora careçam de replicação em estudos com grandes amostras (o que tentamos simular por *bootstrap*), encontram suporte na literatura que revela que a produção das citocinas TNF, IL-6 e IL-10 parece estar envolvida na atividade e expressão da indolamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO-1), enzima presente no primeiro estágio do catabolismo do triptofano, descrita em microambientes microbicidas e tolerogênicos, induzida pela ativação do TLR2 (119). Existem evidências *in vitro* e *in vivo* de que os catabólitos do triptofano podem induzir rápida apoptose de células T auxiliares Th1 (mas não de Th2) e por causa de tais efeitos seletivos, o catabolismo do triptofano pode também contribuir para certos estados de doença por meio de um desequilíbrio na resposta das células T auxiliares (120).

As quimiocinas IL-8 e RANTES apresentaram produção aumentada nas culturas de células do grupo dos casos, independentemente de terem ou não sido estimuladas pelo *M. leprae* (Tabela 6), concordando com alguns achados da literatura (121). Sabe-se que *M. leprae* é capaz de reprogramar células de *Schwann* hospedeiras a ponto de as tornarem pluripotentes (assim como células tronco) e que tais células nervosas desdiferenciadas (em função da infecção bacteriana) aumentam a produção de IL-8, RANTES e outras moléculas quimiotáticas de macrófagos a fim de promover a migração do *M. leprae* para outros tecidos (31).

Embora tenhamos trabalhado com culturas de PBMC e não com células de *Schwann* como no estudo supracitado (31), vale considerar a hipótese de que o *M. leprae* poderia estabelecer mecanismos de reprogramação também em células do sistema imunológico como o que foi observado em estudos sobre a *Bordetella pertussis*, bactéria causadora da Coqueluche (122). Foi observado que em pulmões de camundongos infectados com *B. pertussis*, a ação da toxina adenilato ciclase (CyaA) inibiu a diferenciação de monócitos infiltrantes em macrófagos e células dendríticas (123). Além disso, observou-se que a sinalização de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) de CyaA também provocou a desdiferenciação de macrófagos maduros (nos alvéolos pulmonares) para células semelhantes a monócitos (124). Esse tipo de mecanismo contribuiria para evasão imunológica da *Bordetella pertussis* e também, em teoria, do *M. leprae*.

Em relação as Figuras 9A e 9B, observou-se uma mudança no perfil da produção de IL-8 e RANTES, no contexto multivariado onde todas as citocinas e quimiocinas interagem entre si. Sabe-se que a via do NFκB é essencial para a regulação da transcrição tanto de IL-8 quanto de RANTES por meio de reações em cadeia derivadas da ativação de TLR1/TLR2, TLR3 e NOD1 (125). Esse estudo acrescenta que foram necessárias outras vias (MAPKs e ERK1/ERK2) para controlar apenas a transcrição de IL-8 sem controlar a transcrição de RANTES.

As interações entre os componentes bacterianos, fúngicos ou virais com os TLRs ativam a via do NFkB, conduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, bem como as moléculas coestimulatórias necessárias para a ativação das células T (126, 127). Em relação ao gene TLR1, observou-se uma associação significativa entre a variante rs48033095 com a hanseníase em diferentes populações brasileiras, analisadas tanto separadamente quanto em metanálise (128). Em nossa amostra, entretanto, essa associação não foi confirmada.

Na análise de citocinas e quimiocinas estratificadas por genótipos da variante rs4833095 (TLR1), foram observadas, na literatura, diferenças que apontam para um papel funcional desse marcador promovendo alterações significativas na produção da quimiocina MCP-1 (76). Um estudo imuno-histoquímico mostrou que a MCP-1 estava presente em nervos afetados pela hanseníase, indicando que essa quimiocina também estaria associada ao depósito excessivo de matriz extracelular (129), o que pode estar relacionado a lesão do nervo. Apesar da variante rs4833095 ter sido associada à hanseníase em populações brasileiras, corroborando com dados anteriores de Bangladesh (130), não encontramos evidências suficientes para confirmar essa associação na amostra do presente trabalho. Contudo, foi evidenciado que o rs4833095 possa ter um papel regulador na produção de citocinas e quimiocinas na infecção pelo *M. leprae* (76).

Na literatura, em relação à IL-12, foi verificado que culturas de PBMC estimuladas pelo *M. leprae* apresentaram aumento da produção dessa citocina em células de pacientes comparados aos controles, destacando um mecanismo pelo qual IFN- γ desregula IL-10 pela indução de IL-12 (131). Apesar do presente trabalho não ter contemplado a IL-12, percebemos um indício (limítrofe) de maior produção de IL-2 em indivíduos controles portadores de genótipo T/T do rs4833095 do que nos indivíduos doentes portadores do mesmo genótipo (Figura 12A). A literatura indica que parece haver uma ligação entre a IL-2 e a transdução do sinal da IL-12 nas células *natural killer* (NK), de forma que a IL-2 estimula a expressão de dois receptores de IL-12, IL-12R e IL- β 1-12R- β 2, mantendo a expressão de uma proteína crítica envolvida na sinalização de IL-12 nas células NK. Essa resposta funcional parece ser melhorada pela produção de IFN- γ .

Em relação aos SNPs no gene TLR2, estudos revelaram diferentes concentrações de IL-6 e IL-17 relacionadas ao marcador rs3804099, de forma que portadores do alelo T produziram níveis mais elevados dessas citocinas (76). Tal constatação não foi observada no presente trabalho quanto ao SNP rs3804099 mas, na Figura 12B percebemos uma possível tendência de: *i.* indivíduos controles com genótipo T/T produzirem mais IL-17 que os indivíduos doentes portadores do mesmo genótipo (justamente o oposto do observado nos genótipos C/C e C/T); *ii.* indivíduos controles com genótipo C/T produzirem mais IL-6 que os indivíduos doentes portadores do mesmo genótipo (justamente o oposto do observado nos genótipos C/C e T/T).

No gene *TLR4*, já foram identificados diversos polimorfismos e, para alguns deles, foram mostradas associações com a susceptibilidade a infecções bacterianas, considerando a diversidade de estruturas de lipolissacarídeos (LPS) e o reconhecimento diferencial pelo *TLR4* (132). Nossos estudos apontam para uma suposta associação entre a variante rs1927914 no gene *TLR4* e a susceptibilidade à hanseníase (Tabela 1) que difere do estudo (76) que não encontrou associação dessa variante com a hanseníase *per se* ou com reações hansênicas, apesar dos autores não terem considerado um modelo de dominância alélica assim como fizemos no presente trabalho. Esse polimorfismo, por estar localizado na região promotora do gene *TLR4* pode alterar o local de ligação ao fator transcricional, modificar a atividade do promotor e regular a expressão gênica ou a via de sinalização (133). Aparentemente, a proteína TLR4 (vide Anexo D) teria papel relevante em nosso estudo e ao pesquisarmos, na literatura, sobre o perfil dos diferentes tipos de células quanto à presença de receptores do tipo *toll 4*, notamos que os queratinócitos expressam essas proteínas (134). Interessantemente, os queratinócitos parecem desempenhar um papel fundamental na liberação do peptídeo antimicrobiano β -defensina em resposta aos antígenos do *M. leprae* (135).

Considerando a variante rs1927914 do *TLR4* (Figura 10C), verificou-se que os indivíduos do grupo controle portadores do genótipo A/A apresentaram maior produção de RANTES que os indivíduos de mesmo genótipo no grupo dos casos. Assim, o genótipo A/A dessa variante apresentou carácter de proteção no modelo de dominância proposto na Tabela 9C. Embora não diretamente relacionada ao *M. leprae*, observou-se que na infecção pelo *M. tuberculosis* a regulação positiva do fator de transcrição de zíper de leucina básica (Batf2), em macrófagos e células dendríticas, desencadeia a produção de TNF- α , IFN- γ e RANTES, bem como a liberação de radicais livres (136, 137). Assim, pode-se, hipoteticamente, considerar que mecanismos parecidos aconteçam em indivíduos acometidos pela hanseníase. Além disso, a quantificação de citocinas e quimiocinas, associada a genótipos específicos, poderiam contribuir para o diagnóstico da doença, uma vez que os TLRs, enquanto receptores da imunidade inata, exercem papel crucial na ativação de células imunes por meio da sinalização intracelular. Em especial o TLR4, fundamental na vigilância imunológica contra infecções bacterianas intracelulares (137).

5.2 A TECNOLOGIA DE IA COMO FORMA DE INCLUSÃO, ACESSIBILIDADE E COMBATE À HANSENÍASE

O protocolo de análise de dados que realizamos ao longo do presente trabalho visou contemplar uma série de boas práticas de modelagem estatística baseada em IA, onde abordamos etapas como: imputação/exclusão de dados; seleção de variáveis e respectiva normalização; e, por fim, aplicação de um algoritmo eficiente de reconhecimento de padrões. Nesse sentido, trataram-se os dados extremos ou faltantes e em seguida selecionaram-se as variáveis que, juntas, forneciam menor erro de predição do modelo baseado em RF. Considerando que esta seleção de variáveis poderia ser otimizada para remover certas redundâncias (presença de colinearidade) eventualmente prejudiciais aos modelos, percebemos que a redução de dimensionalidade poderia agregar maior valor à predição se focássemos apenas no reconhecimento de padrões clínicos (doente *vs* sadio) e imunológicos (citocinas e quimiocinas) da hanseníase. Sendo assim, as variáveis genéticas (SNPs) não agregaram melhoria no modelo de predição, sendo, portanto, excluídas do modelo final sem que o mesmo perdesse acurácia. Talvez variáveis genéticas fariam algum efeito significativo no modelo em questão caso dispuséssemos de milhares de indivíduos na amostra, conforme simulado com *bootstrap* (Figuras 10 a 12). A fim de evitar desdobramentos majoritariamente estatísticos a esse trabalho, omitimos os modelos intermediários que não foram relevantes na identificação de indivíduos doentes, visto que o intuito principal desse trabalho é o uso da ferramenta como suporte ao diagnóstico. Foi apresentado apenas o modelo final.

Sabemos, no entanto, que a hanseníase é uma doença com diagnóstico hegemonicamente clínico e que a escassez de sintomas iniciais pode contribuir para erros no diagnóstico ou para o sub-diagnóstico (138) que deve ser efetuado precocemente para reduzir as fontes de transmissão e prevenir os agravos característicos da doença. Não surpreendentemente, as variáveis que tiveram maior peso na formulação de modelos intermediários de predição da hanseníase foram aquelas relacionadas aos aspectos clínicos, de tal forma que as variáveis imunológicas e genéticas fossem matematicamente insignificantes. Essa hegemonia de variáveis clínicas nos modelos de predição da hanseníase ocorreu potencialmente em virtude de existir protocolos bastante consolidados, e até rígidos, quanto a classificação da doença como, por exemplo, o número de manchas na pele dos pacientes suspeitos.

Embora o modelo final apresentado nessa tese contemple exclusivamente variáveis imunológicas padronizadas dos indivíduos portadores (casos) e não portadores de hanseníase (controles), sentimos a necessidade de contribuir com a classificação clínica em si. Foi elaborado um aplicativo de suporte à classificação clínica da hanseníase, baseado nos protocolos da OMS implantados pelo MSB. Como resposta ao empenho de toda equipe envolvida no projeto que culminou na presente tese, dispondo do livre acesso aos dados do DATASUS, desenvolvemos um aplicativo multiplataforma que poderá, no futuro próximo, atender cidadãos nos mais remotos postos de saúde do país, conforme descrevemos no artigo publicado no corrente ano (139). Contudo, vale ressaltar que esse aplicativo carece de validação, até então inviabilizada pela pandemia por COVID-19, e poderá levar em consideração reconhecimento de imagens (manchas e lesões) para melhorar a predição de casos, otimizando assim o tratamento em termos de duração e orçamento, em sintonia com a promoção de eficiência do SUS.

A hanseníase, doença milenar, carece ainda de maior engajamento, uma vez que o Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis (DVDT) constatou que alguns indicadores operacionais propostos pelo MSB confirmaram falhas significativas dos serviços de saúde. Há menos de cinco anos, o Brasil apresentou menos de 80% de cobertura, apesar desse indicador não captar os contatos sociais, não verificar o seguimento dos contatos ao longo do tempo e, adicionalmente, não permitir a avaliação da qualidade das ações previstas, como o exame dermatoneurológico, por exemplo. Outro fato importante é que cerca de 18% dos casos nas coortes de 2017 não apresentaram saída no sistema de notificação, fato que não descarta a hipótese de que sejam mantidas fontes de infecção nas comunidades, mesmo quando o diagnóstico é estabelecido (19).

5.3 ACOMPANHAMENTO DOS CONTATOS

A fim de combater a doença de forma eficaz, todos os contatos domiciliares e sociais necessitam ser acompanhados, submetidos a exame dermatoneurológico e serem alvo de ações de educação em saúde, inclusive com imunoprofilaxia como intervenção (87). Segundo o DVDT, é essencial que os contatos sejam acompanhados, no mínimo, durante cinco anos, uma vez que a hanseníase tem longo período de incubação (87).

A inclusão de um aplicativo auxílio ao diagnóstico no SUS permitiria que equipes de saúde, previamente capacitadas, façam o acompanhamento e a triagem dos contatos de pacientes com hanseníase. Dessa forma, buscamos otimizar o trabalho da equipe médica que poderá realizar avaliações mais criteriosas em pacientes que putativamente estejam acometidos pela doença. O presente trabalho apresentou abordagens clínicas, imunológicas e moleculares, mas é notória a ausência de equipamentos sofisticados para exames mais complexos no serviço público de saúde, especialmente em áreas remotas.

Na Figura 15, estendendo a discussão para os onze contatos com maior risco de evoluírem para formas clínicas da hanseníase (‘1194’ a ‘1256’), percebemos que nove deles (81,8%) apresentaram o alelo de susceptibilidade (G), segundo o presente estudo, nas variantes rs1927914 e rs2737190 do gene *TLR4*. Além disso, a maioria desses contatos eram jovens com menos de 21 anos de idade, fato que pode representar a fragilidade do controle da doença e a permanência de sua endemicidade (140).

Aparentemente, o modelo de IA proposto no presente estudo parece ter conseguido captar a informação de susceptibilidade à hanseníase contida nesses SNPs (rs1927914 e rs2737190) a partir da correlação entre citocinas e quimiocinas. Considerando que a genotipagem generalizada desses SNPs demandaria, atualmente, consideráveis investimentos ao SUS, entendemos que nosso trabalho poderia otimizar investimentos no combate à hanseníase no Brasil pois ensaios imunológicos costumam ser mais acessíveis financeiramente que ensaios genéticos.

5.4 NATUREZA DA AMOSTRA, QUALIDADE DOS DADOS, PLASTICIDADE DAS ANÁLISES E SOLUÇÕES PROPOSTAS

De forma geral, ao analisarmos as Tabelas 2 a 6, foi percebido uma variedade de informações coletadas que poderiam ser readequadas em futuros processos de busca ativa. Inclusive, isso foi evidenciado pela seleção de variáveis a partir do algoritmo *Boruta* (em análises prévias, não apresentadas no presente trabalho, para alcançar o modelo final apenas com variáveis imunológicas). Contudo, antes mesmo da aplicação desse método de seleção, algumas variáveis foram retiradas das análises por apresentarem quase nenhuma variância (*e.g.* dados do exame dermatoneurológico das questões 44 e 46 do Anexo A). Tais considerações são válidas, mesmo que atualmente a ciência conte com uma considerável capacidade e disponibilidade computacional para tratar enormes quantidades de dados. Sabe-se que é importante estabelecer filtros ao “*big data*” a fim de inibir seu potencial de distorcer elucidacões sobre problemas cotidianos, devido principalmente as correlações derivadas do mero acaso (141).

Muitas das variáveis apresentaram *missing values* que denotam uma possível incapacidade do questionário em captar certas respostas dos participantes, seja por uma má formulação das respectivas opções de preenchimento dos formulários ou por curta duração das consultas que geralmente buscam otimizar o tempo a fim de atender o máximo de pessoas, constituindo o princípio da eficiência do serviço público. Tais contratemplos são naturalmente passíveis de ocorrer mesmo em um estudo piloto (142) que é uma implementação interessante em trabalhos semelhantes ao presente estudo. Reconhecer as variáveis e delineá-las muito bem potencializa a completude das informações, independentemente das excelentes metodologias disponíveis para imputação de dados (143).

6 CONCLUSÃO

A hanseníase insiste em revelar-se uma doença desafiadora, intrigante e especialmente complexa, carente de métodos precisos para o diagnóstico precoce. O perfil sociodemográfico parece não exercer nenhum papel na caracterização dessa doença negligenciada que deve ser, o quanto antes, excluída do rol de problemas de saúde pública. Tal feito pode ser alcançado por métodos não convencionais de diagnóstico e pela disseminação de agentes de saúde capacitados nas mais remotas áreas do território brasileiro.

Os parâmetros imunológicos em paciente com hanseníase aparentam tendências de correlação não lineares que raramente podem ser captadas sem a aplicação de análises multivariadas. O contraste entre perfis de citocinas entre os indivíduos doentes e os supostamente não contaminados com o *M. leprae* trazem à tona interessantes hipóteses, em especial no dueto de quimiocinas IL-8/RANTES que parecem carecer de mais estudos específicos em relação à hanseníase. Ressaltamos que o próprio contexto multifacetado dos fatores imunológicos descartaria hipóteses convencionais de estudo. Podemos dizer que as citocinas e quimiocinas seriam melhor caracterizadas por análise de componentes principais ou por outros métodos similares de análises multivariadas.

Quanto à genética, parâmetros moleculares como SNPs podem apresentar dificuldades para revelar associações na ausência de grandes amostras. Em contraste ao tamanho amostral adotado em outros estudos sobre polimorfismo, o presente trabalho careceria de replicação em outras áreas endêmicas. Seria de grande valia a criação de uma base de dados suficientemente grande para que parâmetros genéticos possam contribuir com modelos de inteligência artificial no futuro combate à hanseníase. Percebemos também que algoritmos de reamostragem como o *bootstrap* seriam boas soluções em contextos similares aos apresentados no presente trabalho, justamente a fim de mitigar vieses de interpretação inerentes a estudos em pequenas amostras. Reservadas as limitações de tamanho amostral, a imunidade inata via TLR4 pode ser útil no auxílio ao diagnóstico precoce da hanseníase, em especial no tocante as variantes rs4986790, rs2149356, rs1927914 e rs2737190. No que diz respeito a imunogenética, polimorfismos no gene IL-10 (rs1554286, rs3024490, rs1800872 e rs1800871) parecem influenciar no aumento da produção de TNF no indivíduos acometidos pela hanseníase.

Em contextos complexos como o apresentado nesse trabalho, enfatizamos a importância da aplicação de algoritmos baseados em inteligência artificial uma vez que tal implementação apresenta custo computacional irrisório quando comparadas ao montante demandado em estudos sobre hanseníase. A aplicação de inteligência artificial tem potencial de alavancar os estudos em qualquer outra doença negligenciada. Nosso modelo de IA foi eficiente o suficiente para captar a interação de variáveis imunológicas relacionadas ao risco de desenvolver a hanseníase. Foi observada uma qualidade tão significativa que dispensou a inclusão de variáveis genéticas para melhorar a *performance* na classificação doente/controle. Atualmente, é possível implementar modelos de IA sem conhecimentos estritamente técnicos, mediante soluções apresentadas por gigantes empresas de tecnologia que disponibilizam *softwares* com interfaces muito intuitivas, disponíveis até mesmo por meio de navegadores de *internet*. Como prova disso, desenvolvemos, também, um aplicativo com enorme potencial para auxiliar na classificação operacional da hanseníase e disseminar informações sobre a doença em diversas regiões do Brasil.

Concluimos, por fim, que a falta de inovação em análise de dados, a despeito de todos os recursos computacionais e estatísticos atualmente disponíveis na literatura, pode ser, talvez, uma forma ainda mais grave de negligenciar doenças como a hanseníase.

REFERÊNCIAS

- 1 GRZYBOWSKI, A.; SAK, J.; PAWLIKOWSKI, J.; NITA, M. Leprosy: Social implications from antiquity to the present. *Clinics in Dermatology*, v. 34, n. 1, p. 8–10, jan 2016.
- 2 DE FÁTIMA LAPCHENSK, A.; HARDT, L. P. A. Profilaxia reversa: o estigma da lepra do hospital para a cidade. *Saúde e Sociedade*, v. 27, n. 4, p. 1081–1093, oct 2018.
- 3 DAVEY, T. F. THE WORLD HEALTH ORGANIZATION AND LEPROSY. *Leprosy Review*, v. 48, n. 4, 1977.
- 4 DA SILVA NEUMANN, A.; DE ALMEIDA DIAS, F.; DA SILVA FERREIRA, J.; FONTES, A. N. B.; ROSA, P. S.; MACEDO, R. E.; OLIVEIRA, J. H.; DE FIGUEIREDO TEIXEIRA, R. L.; PESSOLANI, M. C. V.; MORAES, M. O.; SUFFYS, P. N.; OLIVEIRA, P. L.; SORGINE, M. H. F.; LARA, F. A. Experimental infection of *rhodnius prolixus* (hemiptera, triatominae) with mycobacterium leprae indicates potential for leprosy transmission. *PLOS ONE*, v. 11, n. 5, p. e0156037, may 2016.
- 5 DA SILVA, M. B.; PORTELA, J. M.; LI, W.; JACKSON, M.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; HIDALGO, A. S.; BELISLE, J. T.; BOUTH, R. C.; GOBBO, A. R.; BARRETO, J. G.; MINERVINO, A. H. H.; COLE, S. T.; AVANZI, C.; BUSSO, P.; FRADE, M. A. C.; GELUK, A.; SALGADO, C. G.; SPENCER, J. S. Evidence of zoonotic leprosy in pará, brazilian amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 6, p. e0006532, jun 2018.
- 6 DE MEDEIROS OLIVEIRA, I. V. P.; DEPS, P. D.; DE PAULA ANTUNES, J. M. A. Armadillos and leprosy: from infection to biological model. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 61, 2019.
- 7 RAO, P. Global leprosy strategy 2016–2020: Issues and concerns. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, v. 83, n. 1, p. 4, 2017.
- 8 GIESEL, L. M.; PITTA, I. J. R.; DA SILVEIRA, R. C.; ANDRADE, L. R.; VITAL, R. T.; DA COSTA NERY, J. A.; DE ANDREA VILAS BOAS HACKER, M.; SARNO, E. N.; RODRIGUES, M. M. J. Clinical and neurophysiological features of leprosy patients with neuropathic pain. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 98, n. 6, p. 1609–1613, jun 2018.
- 9 DA SAÚDE. SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA, B. M. Guia para o controle da hanseníase. Brasília: Ministério da saúde, 2002.
- 10 MCDUGALL, C. THE DIAGNOSIS OF LEPROSY: CLINICAL AND BACTERIOLOGICAL. *Leprosy Review*, v. 46, n. 1, 1975.
- 11 DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, B. M.; DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, B. M. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase, 2010.

- 12 SOUSA, M. L.; SARRAGUÇA, M. C.; DOS SANTOS, A. O.; SARRAGUÇA, J. M.; LOPES, J.; RIBEIRO, P. R. S. A new salt of clofazimine to improve leprosy treatment. *Journal of Molecular Structure*, v. 1214, p. 128226, aug 2020.
- 13 MAYMONE, M. B.; VENKATESH, S.; LAUGHTER, M.; ABDAT, R.; HUGH, J.; DACSO, M. M.; RAO, P. N.; STRYJEWSKA, B. M.; DUNNICK, C. A.; DELLAVALLE, R. P. Leprosy: Treatment and management of complications. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 83, n. 1, p. 17–30, jul 2020.
- 14 RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 11, n. 6, p. 464–470, jun 2011.
- 15 GELUK, A.; BOBOSHA, K.; VAN DER PLOEG-VAN SCHIP, J. J.; SPENCER, J. S.; BANU, S.; MARTINS, M. V. S. B.; CHO, S.-N.; FRANKEN, K. L. M. C.; KIM, H. J.; BEKELE, Y.; UDDIN, M. K. M.; HADI, S. A.; ASEFFA, A.; PESSOLANI, M. C. V.; PEREIRA, G. M. B.; DOCKRELL, H. M.; OTTENHOFF, T. H. M. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. *The Journal of Immunology*, v. 188, n. 10, p. 4782–4791, apr 2012.
- 16 VENKATESAN, S.; THANGARAJU, P. Leprosy in french polynesia—points focused. *New Microbes and New Infections*, v. 30, p. 100559, jul 2019.
- 17 PANIGRAHI, S.; GALHOTRA, A.; PAL, A. Leprosy—a raging persistent enigma. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, v. 8, n. 6, p. 1863, 2019.
- 18 MANTON, K. Population and labor force aging, effect on socio-economic development in brazil, russia, india and china. In: *International Encyclopedia of Public Health*. Elsevier, 2008. p. 170–181.
- 19 BOIGNY, R. N.; DE SOUZA, E. A.; ROMANHOLO, H. S. B.; DE ARAÚJO, O. D.; DE ARAÚJO, T. M. E.; CARNEIRO, M. A. G.; GRIJÓ, M. D. F.; DE LOURDES FERREIRA BASTOS HENZ, N.; DA SILVA DOS REIS, A.; PINTO, M. S. A. P.; BARBOSA, J. C.; JR., A. N. R. Persistência da hanseníase em redes de convívio domiciliar: sobreposição de casos e vulnerabilidade em regiões endêmicas no brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 35, n. 2, 2019.
- 20 DE DESENVOLVIMENTO DA EPIDEMIOLOGIA EM SERVIÇOS, C.-G. Guia de vigilância em saúde : volume único [recurso eletrônico]. Guia 3^a. ed., Brasil, Ministério da Saúde, 2019. ISBN: 978-85-334-2706-8.
- 21 NERY, J. S.; PEREIRA, S. M.; RASELLA, D.; PENNA, M. L. F.; AQUINO, R.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L.; PENNA, G. O. Effect of the brazilian conditional cash transfer and primary health care programs on the new case detection rate of leprosy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 11, p. e3357, nov 2014.
- 22 FARIA, L.; CALÁBRIA, L. K. Aspectos históricos e epidemiológicos da hanseníase em minas gerais. *Revista de Medicina e Saúde de Brasília*, v. 6, n. 3, 2017.
- 23 TEMOTEO, R. C. D. A.; DE SOUZA, M. M.; DO CARMO ANDRADE DUARTE DE FARIAS, M.; DE ABREU, L. C.; NETTO, E. M. Hanseníase: avaliação em contatos intradomiciliares. *ABCS Health Sciences*, v. 38, n. 3, dec 2013.

- 24 LOPES, V. A. S.; RANGEL, E. M. Hanseníase e vulnerabilidade social: uma análise do perfil socioeconômico de usuários em tratamento irregular. *Saúde em Debate*, v. 38, n. 103, 2014.
- 25 DE SOUSA, G. S.; DA SILVA, R. L. F.; XAVIER, M. B. Hanseníase e atenção primária à saúde: uma avaliação de estrutura do programa. *Saúde em Debate*, v. 41, n. 112, p. 230–242, mar 2017.
- 26 OPROMOLLA, D. V. A.; MACIEIRA, S. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. Technical report, Instituto Lauro de Souza Lima, 2000.
- 27 DEGANG, Y.; AKAMA, T.; HARA, T.; TANIGAWA, K.; ISHIDO, Y.; GIDOH, M.; MAKINO, M.; ISHII, N.; SUZUKI, K. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in mycobacterium leprae-infected macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 12, p. e1936, dec 2012.
- 28 FALUS, O. Leprosy – a stigmata in the 21st century. *Orvosi Hetilap*, v. 152, n. 7, p. 246–251, feb 2011.
- 29 RAMBUKKANA, A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of mycobacterium leprae. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, n. 1, p. 21–27, feb 2001.
- 30 RAMBUKKANA, A. Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. *Progress in Neurobiology*, v. 91, n. 2, p. 102–107, jun 2010.
- 31 MASAKI, T.; QU, J.; CHOLEWA-WACLAW, J.; BURR, K.; RAAUM, R.; RAMBUKKANA, A. Reprogramming adult schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell*, v. 152, n. 1-2, p. 51–67, jan 2013.
- 32 MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. *Current Opinion in Immunology*, v. 22, n. 1, p. 48–54, feb 2010.
- 33 RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. A CLASSIFICATION OF LEPROSY FOR RESEARCH PURPOSES. *Leprosy Review*, v. 33, n. 2, 1962.
- 34 NEDER, L.; RONDON, D. A.; CURY, S. S.; DA SILVA, C. A. Musculoskeletal manifestations and autoantibodies in children and adolescents with leprosy. *Jornal de Pediatria*, v. 90, n. 5, p. 457–463, sep 2014.
- 35 ARAUJO, S.; REZENDE, M. M. F.; DE SOUSA, D. C. R.; ROSA, M. R.; DOS SANTOS, D. C.; GOULART, L. R.; GOULART, I. M. B. Risk-benefit assessment of bacillus calmette-guérin vaccination, anti-phenolic glycolipid i serology, and mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. 6, p. 739–745, dec 2015.
- 36 GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao mycobacterium leprae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 4, p. 363–375, aug 2002.

- 37 DE VIGILÂNCIA E DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS, D. Guia prático sobre a hanseníase. Guia 1^a. ed., Brasil, Ministério da Saúde, 2017. ISBN: 978-85-334-2542-2.
- 38 The final push strategy to eliminate leprosy as a public health problem: questions and answers. *Leprosy Review*, v. 73, n. 3, p. 279–281, sep 2002.
- 39 CALLARD, R.; GEORGE, A. J.; STARK, J. Cytokines, chaos, and complexity. *Immunity*, v. 11, n. 5, p. 507–513, nov 1999.
- 40 LACKIE, J. C. In: *The Dictionary of Cell & Molecular Biology*. : Elsevier, 2013. p. 88–161.
- 41 RAPORT, C. J.; GRAY, P. W. Chemokines and chemokine receptors: Structure and function. In: *Handbook of Cell Signaling*. : Elsevier, 2003. p. 149–153.
- 42 YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; DEANS, R.; WEINBERG, K.; REA, T.; BLOOM, B.; MODLIN, R. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, Washington, v. 254, n. 5029, p. 277–279, oct 1991.
- 43 MODLIN, R. L. Th1-th2 paradigm: Insights from leprosy. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 102, n. 6, p. 828–832, jun 1994.
- 44 ALCAÏS, A.; MIRA, M.; CASANOVA, J.-L.; SCHURR, E.; ABEL, L. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Current Opinion in Immunology*, v. 17, n. 1, p. 44–48, feb 2005.
- 45 FROES, L. A. R.; TRINDADE, M. A. B.; SOTTO, M. N. Immunology of leprosy. *International Reviews of Immunology*, p. 1–21, nov 2020.
- 46 MOURA, R. S.; PENNA, G. O.; FUJIWARA, T.; DE ANDRADE PONTES, M. A.; CRUZ, R.; DE SÁ GONÇALVES, H.; PENNA, M. L. F.; CARDOSO, L. P. V.; DE ARAÚJO STEFANI, M. M.; BÜHRER-SÉKULA, S. Evaluation of a rapid serological test for leprosy classification using human serum albumin as the antigen carrier. *Journal of Immunological Methods*, v. 412, p. 35–41, oct 2014.
- 47 DUPNIK, K. M.; BAIR, T. B.; MAIA, A. O.; AMORIM, F. M.; COSTA, M. R.; KEESEN, T. S. L.; VALVERDE, J. G.; D. C. A. P. QUEIROZ, M.; MEDEIROS, L. L.; DE LUCENA, N. L.; WILSON, M. E.; NOBRE, M. L.; JOHNSON, W. D.; JERONIMO, S. M. B. Transcriptional changes that characterize the immune reactions of leprosy. *Journal of Infectious Diseases*, v. 211, n. 10, p. 1658–1676, nov 2014.
- 48 KODRATI, A.; SALIM, E. M.; HAFY, Z. Comparison of serum interleukin 10 levels between leprosy and non-leprosy population. *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, v. 21, n. 1, p. 39–44, mar 2021.
- 49 SAINI, C.; SRIVASTAVA, R.; KHANNA, N.; RAMESH, V.; SHARMA, A. IL-6 promotes pathogenic th17 in t1r leprosy reactions by stimulating il17 producing by IL-6r pathway. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 101, p. 462–463, dec 2020.
- 50 DE SOUSA, J. R.; SOTTO, M. N.; QUARESMA, J. A. S. Leprosy as a complex infection: Breakdown of the th1 and th2 immune paradigm in the immunopathogenesis of the disease. *Frontiers in Immunology*, v. 8, nov 2017.

- 51 MAEDA, Y.; GIDOH, M.; ISHII, N.; MUKAI, C.; MAKINO, M. Assessment of cell mediated immunogenicity of mycobacterium leprae-derived antigens. *Cellular Immunology*, v. 222, n. 1, p. 69–77, mar 2003.
- 52 KRUTZIK, S. R.; OCHOA, M. T.; SIELING, P. A.; UEMATSU, S.; NG, Y. W.; LEGASPI, A.; LIU, P. T.; COLE, S. T.; GODOWSKI, P. J.; MAEDA, Y.; SARNO, E. N.; NORGDARD, M. V.; BRENNAN, P. J.; AKIRA, S.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Activation and regulation of toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature Medicine*, v. 9, n. 5, p. 525–532, apr 2003.
- 53 MAHLA, R. S. Sweeten PAMPs: role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology. *Frontiers in Immunology*, v. 4, 2013.
- 54 DAS, S.; CHOWDHURY, B. P.; GOSWAMI, A.; PARVEEN, S.; JAWED, J.; PAL, N.; MAJUMDAR, S. Mycobacterium indicus pranii (MIP) mediated host protective intracellular mechanisms against tuberculosis infection: Involvement of TLR-4 mediated signaling. *Tuberculosis*, v. 101, p. 201–209, dec 2016.
- 55 BECK, D. B.; AKSENTIJEVICH, I. Biochemistry of autoinflammatory diseases: Catalyzing monogenic disease. *Frontiers in Immunology*, v. 10, jan 2019.
- 56 SAGHAZADEH, A.; REZAEI, N. Introductory chapter: Toll-like receptors. In: *Toll-like Receptors*. : IntechOpen, jan 2020.
- 57 WONG, S. H.; GOCHHAIT, S.; MALHOTRA, D.; PETTERSSON, F. H.; TEO, Y. Y.; KHOR, C. C.; RAUTANEN, A.; CHAPMAN, S. J.; MILLS, T. C.; SRIVASTAVA, A.; RUDKO, A.; FREIDIN, M. B.; PUZYREV, V. P.; ALI, S.; AGGARWAL, S.; CHOPRA, R.; REDDY, B. S. N.; GARG, V. K.; ROY, S.; MEISNER, S.; HAZRA, S. K.; SAHA, B.; FLOYD, S.; KEATING, B. J.; KIM, C.; FAIRFAX, B. P.; KNIGHT, J. C.; HILL, P. C.; ADEGBOLA, R. A.; HAKONARSON, H.; FINE, P. E. M.; PITCHAPPAN, R. M.; BAMEZAI, R. N. K.; HILL, A. V. S.; VANNBERG, F. O. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 7, p. e1000979, jul 2010.
- 58 MAZINI, P. S.; ALVES, H. V.; REIS, P. G.; LOPES, A. P.; SELL, A. M.; SANTOS-ROSA, M.; VISENTAINER, J. E. L.; RODRIGUES-SANTOS, P. Gene association with leprosy: A review of published data. *Frontiers in Immunology*, v. 6, jan 2016.
- 59 FAVA, V. M.; MANRY, J.; COBAT, A.; ORLOVA, M.; THUC, N. V.; MORAES, M. O.; SALES-MARQUES, C.; STEFANI, M. M. A.; LATINI, A. C. P.; BELONE, A. F.; THAI, V. H.; ABEL, L.; ALCAÏS, A.; SCHURR, E. A genome wide association study identifies a lncRna as risk factor for pathological inflammatory responses in leprosy. *PLOS Genetics*, v. 13, n. 2, p. e1006637, feb 2017.
- 60 RIVAS, M. A.; KOSKELA, J.; HUANG, H.; STEVENS, C.; AVILA, B. E.; HARITUNIANS, T.; NEALE, B. M.; KURKI, M.; GANNA, A.; GRAHAM, D.; GLASER, B.; PETER, I.; ATZMON, G.; BARZILAI, N.; LEVINE, A. P.; SCHIFF, E.; PONTIKOS, N.; WEISBURD, B.; KARCZEWSKI, K. J.; MINIKEL, E. V.; PETERSEN, B.-S.; BEAUGERIE, L.; SEKSIK, P.; COSNES, J.; SCHREIBER, S.; BOKEMEYER, B.; BETHGE, J.; HEAP, G.; AHMAD, T.; PLAGNOL, V.; SEGAL, A. W.; TARGAN, S.; TURNER, D.; SAAVALAINEN, P.; FARKKILA, M.;

- KONTULA, K.; PIRINEN, M.; PALOTIE, A.; BRANT, S. R.; DUERR, R. H.; SILVERBERG, M. S.; RIOUX, J. D.; WEERSMA, R. K.; FRANKE, A.; MACARTHUR, D. G.; JALAS, C.; SOKOL, H.; XAVIER, R. J.; PULVER, A.; CHO, J. H.; MCGOVERN, D. P.; DALY, M. J.; AND. Insights into the genetic epidemiology of crohn's and rare diseases in the ashkenazi jewish population. sep 2016.
- 61 SAUER, M. E.; SALOMÃO, H.; RAMOS, G. B.; D'ESPINDULA, H. R.; RODRIGUES, R. S.; MACEDO, W. C.; SINDEAUX, R. H.; MIRA, M. T. Genetics of leprosy: Expected and unexpected developments and perspectives. *Clinics in Dermatology*, v. 33, n. 1, p. 99–107, jan 2015.
- 62 PINTO, P.; SALGADO, C.; SANTOS, N. P. C.; SANTOS, S.; DOS SANTOS, Â. R. Influence of genetic ancestry on INDEL markers of NFK β 1, CASP8, PAR1, IL4 and CYP19a1 genes in leprosy patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 9, p. e0004050, sep 2015.
- 63 ZHAN, X.; GAO, H.; SUN, W. Correlations of IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 and TNF- α with the pathological stage and prognosis of glioma patients. *Minerva Medica*, v. 111, n. 2, apr 2020.
- 64 ALVES, H. V.; ALBUQUERQUE, E. P.; MAZINI, P. S.; AQUINO, J. S.; LIMA, A. L.; VISENTAINER, J. E. P022 HLA-DRB1 and HLA-DQA1/b1 alleles in association with leprosy compared to household contacts. *Human Immunology*, v. 77, p. 56, sep 2016.
- 65 STINGHEN, S. T. *Polimorfismos do gene VSIG4 em pacientes com hanseníase e coinfeção com hepatite B de Curitiba-PR e Sinop-MT*, 2015. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas).
- 66 Loci associated with leprosy (efo:0001054). http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Phenotype/Locations?oa=EF0:0001054. Accessed: 2021-03-21.
- 67 CAMBRI, G.; MIRA, M. T. Genetic susceptibility to leprosy—from classic immune-related candidate genes to hypothesis-free, whole genome approaches. *Frontiers in Immunology*, v. 9, jul 2018.
- 68 BROCHADO, M. J. F.; GATTI, M. F. C.; ZAGO, M. A.; ROSELINO, A. M. Association of the solute carrier family 11 member 1 gene polymorphisms with susceptibility to leprosy in a brazilian sample. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 2, p. 101–105, jan 2016.
- 69 MARAHATTA, S. B.; ADHIKARI, B. B. Risk factors of stigma related to leprosy—a systematic review. *International Journal of Epidemiology*, v. 44, n. suppl_1, p. i117–i117, sep 2015.
- 70 ZHANG, D.-F.; LI, H.-L.; ZHENG, Q.; BI, R.; XU, M.; WANG, D.; ZHU, G.-P.; LI, Y.-Y.; YAO, Y.-G. Mapping leprosy-associated coding variants of interleukin genes by targeted sequencing. *Clinical Genetics*, v. 99, n. 6, p. 802–811, mar 2021.

- 71 SANTORO, A. *Identificação de Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) no gene Nove-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED) em Eucalyptus*, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas).
- 72 VERRELLI, B. C. A primer of genome science. third edition. by greg gibson and spencer v. muse. sunderland (massachusetts): Sinauer associates. \$69.95 (paper). xiii 370 p. ill. index. ISBN: 978-0-87893-236-8. 2009. *The Quarterly Review of Biology*, v. 85, n. 1, p. 106–107, mar 2010.
- 73 MARTIN, L. C. *Identificação de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) no gene colina monooxigenase relacionado ao metabolismo da glicina betaína em Eucalyptus*, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas).
- 74 CARDOSO, C. C.; PEREIRA, A. C.; DE SALES MARQUES, C.; MORAES, M. O. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiology*, v. 6, n. 5, p. 533–549, may 2011.
- 75 ALVARADO-ARNEZ, L. E.; AMARAL, E. P.; SALES-MARQUES, C.; DURÃES, S. M. B.; CARDOSO, C. C.; SARNO, E. N.; PACHECO, A. G.; LANA, F. C. F.; MORAES, M. O. Association of IL10 polymorphisms and leprosy: A meta-analysis. *PLOS ONE*, v. 10, n. 9, p. e0136282, sep 2015.
- 76 DE LIMA SANTANA, N.; RÊGO, J. L.; OLIVEIRA, J. M.; DE ALMEIDA, L. F.; BRAZ, M.; MACHADO, L. M. M.; MACHADO, P. R. L.; CASTELLUCCI, L. C. Polymorphisms in genes TLR1, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 4, p. 260–268, mar 2017.
- 77 MI, Z.; LIU, H.; ZHANG, F. Advances in the immunology and genetics of leprosy. *Frontiers in Immunology*, v. 11, apr 2020.
- 78 RUSSELL, S. Artificial intelligence. In: *Ethics of Artificial Intelligence*. : Oxford University Press, sep 2020. p. 327–341.
- 79 HAENLEIN, M.; KAPLAN, A. A brief history of artificial intelligence: On the past, present, and future of artificial intelligence. *California Management Review*, v. 61, n. 4, p. 5–14, jul 2019.
- 80 KAPLAN, A.; HAENLEIN, M. Siri, siri, in my hand: Who’s the fairest in the land? on the interpretations, illustrations, and implications of artificial intelligence. *Business Horizons*, v. 62, n. 1, p. 15–25, jan 2019.
- 81 Big data. In: *The Data Revolution: Big Data, Open Data, Data Infrastructures & Their Consequences*. : SAGE Publications Ltd. p. 67–79.
- 82 OLADIPUPO, T. Types of machine learning algorithms. In: *New Advances in Machine Learning*. : InTech, feb 2010.
- 83 FRANCO, B.; BUSIN, L.; CHIANCA, T. C. M.; MORAES, V. M.; PIRES, A. U. B.; DE FÁTIMA LUCENA, A. Associações entre discriminadores do sistema de triagem de manchester e diagnósticos de enfermagem. *Revista Gaúcha de Enfermagem*, v. 39, n. 0, aug 2018.

- 84 DO CARMO, B. A.; DE SOUZA, G. Atuação do enfermeiro na classificação de risco através do protocolo de manchester: uma revisão da literatura. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. Esp., n. 11, p. S1081–S1088, 2018.
- 85 Case-control studies: Design, conduct, analysis. *Annals of Internal Medicine*, v. 98, n. 1, p. 122, jan 1983.
- 86 ROMANHOLO, H. S. B.; DE SOUZA, E. A.; JÚNIOR, A. N. R.; KAISER, A. C. G. C. B.; DA SILVA, I. O.; BRITO, A. L.; VASCONCELLOS, C. Surveillance of intradomiciliary contacts of leprosy cases: perspective of the client in a hyperendemic municipality. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 71, n. 1, p. 163–169, feb 2018.
- 87 DE VIGILÂNCIA E DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS, D. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública. Guia 1^a. ed., Brasil, Ministério da Saúde, 2017. ISBN: 978-85-334-2348-0.
- 88 COCHRANE, R. G. A CRITICAL APPRAISAL OF THE MADRID CLASSIFICATION OF LEPROSY. *Repura*, v. 24, n. 4, p. 236–246, 1955.
- 89 DE OLIVEIRA, L. B. P. *Identificação de parâmetros imunológicos, nutricionais e parasitológicos (S. mansoni) em um estudo caso-controle associado à hanseníase*, 2020. Tese (Doutorado Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular).
- 90 R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.
- 91 LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: AnRPackage for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, v. 25, n. 1, 2008.
- 92 KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. *factoextra: Extract and visualize the results of multivariate data analyses*, 2020. R package version 1.0.7.
- 93 GONZALEZ, J. R.; ARMENGOL, L.; SOLE, X.; GUINO, E.; MERCADER, J. M.; ESTIVILL, X.; MORENO, V. SNPassoc: an r package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics*, v. 23, n. 5, p. 654–655, jan 2007.
- 94 GRAFFELMAN, J.; CAMARENA, J. M. Graphical tests for hardy-weinberg equilibrium based on the ternary plot. *Human Heredity*, v. 65, n. 2, p. 77–84, sep 2007.
- 95 EMIGH, T. H. A comparison of tests for hardy-weinberg equilibrium. *Biometrics*, v. 36, n. 4, p. 627, dec 1980.
- 96 WICKHAM, H. *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag New York, 2016. ISBN: 978-3-319-24277-4.
- 97 ADLER, D.; MURDOCH, D. et al. *rgl: 3d visualization using opengl*, 2020. R package version 0.103.5.
- 98 PRASAD, A. M.; IVERSON, L. R.; LIAW, A. Newer classification and regression tree techniques: Bagging and random forests for ecological prediction. *Ecosystems*, v. 9, n. 2, p. 181–199, mar 2006.

- 99 KURSA, M. B.; JANKOWSKI, A.; RUDNICKI, W. R. Boruta – a system for feature selection. *Fundamenta Informaticae*, v. 101, n. 4, p. 271–285, 2010.
- 100 KUHN, M. *caret: Classification and regression training*, 2020. R package version 6.0-86.
- 101 LITTLE, R. J. A.; RUBIN, D. B. *Statistical analysis with missing data*. John Wiley & Sons, Inc., aug 2002.
- 102 EFRON, B. Missing data, imputation, and the bootstrap: Rejoinder. *Journal of the American Statistical Association*, v. 89, n. 426, p. 478, jun 1994.
- 103 VAN BUUREN, S. *Flexible imputation of missing data*. Chapman and Hall/CRC, mar 2012.
- 104 SIVAGANESAN, S. An introduction to the bootstrap (bradley efron and robert j. tibshirani). *SIAM Review*, v. 36, n. 4, p. 677–678, dec 1994.
- 105 WEHRENS, R.; PUTTER, H.; BUYDENS, L. M. The bootstrap: a tutorial. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 54, n. 1, p. 35–52, dec 2000.
- 106 KURSA, M. B.; RUDNICKI, W. R. Feature selection with theBorutaPackage. *Journal of Statistical Software*, v. 36, n. 11, 2010.
- 107 GORDON, A. D.; BENZECRI, J.-P. Correspondence analysis handbook. *Biometrics*, v. 49, n. 2, p. 672, jun 1993.
- 108 WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 2, n. 1-3, p. 37–52, aug 1987.
- 109 GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; FERREIRA, B. L.; MAGGIO, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science & Technology*, v. 72, p. 83–90, feb 2018.
- 110 LEVER, J.; KRZYWINSKI, M.; ALTMAN, N. Principal component analysis. *Nature Methods*, v. 14, n. 7, p. 641–642, jul 2017.
- 111 OLADIPUPO, T. Types of machine learning algorithms. In: *New Advances in Machine Learning*. InTech, feb 2010.
- 112 LIAW, A.; WIENER, M. et al. Classification and regression by randomforest. *R news*, v. 2, n. 3, p. 18–22, 2002.
- 113 GAMA, R. S.; DE SOUZA, M. L. M.; SARNO, E. N.; DE MORAES, M. O.; GONÇALVES, A.; STEFANI, M. M. A.; GARCIA, R. M. G.; DE OLIVEIRA FRAGA, L. A. A novel integrated molecular and serological analysis method to predict new cases of leprosy amongst household contacts. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 6, p. e0007400, jun 2019.
- 114 COX, D. R. Karl pearson and the chi-squared test. In: *Goodness-of-Fit Tests and Model Validity*. Birkhäuser Boston, 2002. p. 3–8.

- 115 LI, Y.; OOSTING, M.; SMEEKENS, S. P.; JAEGER, M.; AGUIRRE-GAMBOA, R.; LE, K. T.; DEELEN, P.; RICAÑO-PONCE, I.; SCHOFFELEN, T.; JANSEN, A. F.; SWERTZ, M. A.; WITHOFF, S.; VAN DE VOSSE, E.; VAN DEUREN, M.; VAN DE VEERDONK, F.; ZHERNAKOVA, A.; VAN DER MEER, J. W.; XAVIER, R. J.; FRANKE, L.; JOOSTEN, L. A.; WIJMENGA, C.; KUMAR, V.; NETEA, M. G. A functional genomics approach to understand variation in cytokine production in humans. *Cell*, v. 167, n. 4, p. 1099–1110.e14, nov 2016.
- 116 CORRIGER, A.; DUCLOS, M.; CORCUFF, J.-B.; LAMBERT, C.; MARCEAU, G.; SAPIN, V.; MACIAN, N.; ROUX, D.; PEREIRA, B.; PICKERING, G. Hormonal status and cognitive-emotional profile in real-life patients with neuropathic pain: A case control study. *Pain Practice*, v. 19, n. 7, p. 703–714, jun 2019.
- 117 CHARLAB, R.; SARNO, E. N.; CHATTERJEE, D.; PESSOLANI, M. C. V. Effect of unique *Mycobacterium lepraephenolic* glycolipid-i (PGL-i) on tumour necrosis factor production by human mononuclear cells. *Leprosy Review*, v. 72, n. 1, 2001.
- 118 BARNES, P. F.; CHATTERJEE, D.; BRENNAN, P. J.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infection and Immunity*, v. 60, n. 4, p. 1441–1446, 1992.
- 119 OLIVEIRA, J. A. P.; GANDINI, M.; SALES, J. S.; FUJIMORI, S. K.; BARBOSA, M. G. M.; FRUTUOSO, V. S.; MORAES, M. O.; SARNO, E. N.; PESSOLANI, M. C. V.; PINHEIRO, R. O. *Mycobacterium leprae* induces a tolerogenic profile in monocyte-derived dendritic cells via TLR2 induction of IDO. *Journal of Leukocyte Biology*, oct 2020.
- 120 FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; ORABONA, C.; SPRECA, A.; FIORETTI, M. C.; PUC CETTI, P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death & Differentiation*, v. 9, n. 10, p. 1069–1077, oct 2002.
- 121 HASAN, Z.; MAHMOOD, A.; ZAFAR, S.; KHAN, A.; HUSSAIN, R. Leprosy patients with lepromalous disease have an up-regulated il-8 response that is unlinked to tnf-alpha responses. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases*, v. 72, p. 35–44, 2004.
- 122 AHMAD, J. N.; SEBO, P. Adenylate cyclase toxin tinkering with monocyte-macrophage differentiation. *Frontiers in Immunology*, v. 11, sep 2020.
- 123 SKOPOVA, K.; TOMALOVA, B.; KANCHEV, I.; ROSSMANN, P.; SVEDOVA, M.; ADKINS, I.; BIBOVA, I.; TOMALA, J.; MASIN, J.; GUIISO, N.; OSICKA, R.; SEDLACEK, R.; KOVAR, M.; SEBO, P. Cyclic AMP-elevating capacity of adenylate cyclase toxin-hemolysin is sufficient for lung infection but not for full virulence of *bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, v. 85, n. 6, apr 2017.
- 124 AHMAD, J. N.; HOLUBOVA, J.; BENADA, O.; KOFRONOVA, O.; STEHLIK, L.; VASAKOVA, M.; SEBO, P. *Bordetella* Adenylate cyclase toxin inhibits monocyte-to-macrophage transition and dedifferentiates human alveolar macrophages into monocyte-like cells. *mBio*, v. 10, n. 5, sep 2019.
- 125 BÉRUBÉ, J.; BOURDON, C.; YAO, Y.; ROUSSEAU, S. Distinct intracellular signaling pathways control the synthesis of IL-8 and RANTES in TLR1/TLR2,

- TLR3 or NOD1 activated human airway epithelial cells. *Cellular Signalling*, v. 21, n. 3, p. 448–456, mar 2009.
- 126 MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, London, v. 388, n. 6640, p. 394–397, jul 1997.
- 127 TAYLOR, B. D.; DARVILLE, T.; FERRELL, R. E.; KAMMERER, C. M.; NESS, R. B.; HAGGERTY, C. L. Variants in toll-like receptor 1 and 4 genes are associated with chlamydia trachomatis among women with pelvic inflammatory disease. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 205, n. 4, p. 603–609, jan 2012.
- 128 DE SALES MARQUES, C.; DE SOUZA, V. N. B.; GUERREIRO, L. T. A.; MARTINS, J. H.; AMARAL, E. P.; CARDOSO, C. C.; DIAS-BATISTA, I. M. F.; DA SILVA, W. L.; NERY, J. A. C.; MEDEIROS, P.; GIGLIOTTI, P.; CAMPANELLI, A. P.; VIRMOND, M.; SARNO, E. N.; MIRA, M. T.; LANA, F. C. F.; CAFFARENA, E. R.; PACHECO, A. G.; PEREIRA, A. C.; MORAES, M. O. Toll-like receptor 1 n248s single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 208, n. 1, p. 120–129, apr 2013.
- 129 MEDEIROS, M. F.; RODRIGUES, M. M. J.; VITAL, R. T.; DA COSTA NERY, J. A.; SALES, A. M.; DE ANDREA HACKER, M.; FERREIRA, H.; CHIMELLI, L.; SARNO, E. N.; ANTUNES, S. L. G. CXCL10, MCP-1, and other immunologic markers involved in neural leprosy. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, v. 23, n. 3, p. 220–229, mar 2015.
- 130 SCHURING, R. P.; HAMANN, L.; FABER, W. R.; PAHAN, D.; RICHARDUS, J. H.; SCHUMANN, R. R.; OSKAM, L. Polymorphism n248s in the human toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 199, n. 12, p. 1816–1819, jun 2009.
- 131 LIBRATY, D. H.; AIRAN, L. E.; UYEMURA, K.; JULLIEN, D.; SPELLBERG, B.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. *Journal of Clinical Investigation*, v. 99, n. 2, p. 336–341, jan 1997.
- 132 MILLER, S. I.; ERNST, R. K.; BADER, M. W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 36–46, jan 2005.
- 133 MINMIN, S.; XIAOQIAN, X.; HAO, C.; BAIYONG, S.; XIAXING, D.; JUNJIE, X.; XI, Z.; JIANQUAN, Z.; SONGYAO, J. Single nucleotide polymorphisms of toll-like receptor 4 decrease the risk of development of hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, v. 6, n. 4, p. e19466, apr 2011.
- 134 PIVARCSI, A. Expression and function of toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *International Immunology*, v. 15, n. 6, p. 721–730, jun 2003.
- 135 COGEN, A. L.; WALKER, S. L.; ROBERTS, C. H.; HAGGE, D. A.; NEUPANE, K. D.; KHADGE, S.; LOCKWOOD, D. N. J. Human beta-defensin 3 is up-regulated in cutaneous leprosy type 1 reactions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 11, p. e1869, nov 2012.

- 136 ROY, S.; GULER, R.; PARIHAR, S. P.; SCHMEIER, S.; KACZKOWSKI, B.; NISHIMURA, H.; SHIN, J. W.; NEGISHI, Y.; OZTURK, M.; HURDAYAL, R.; KUBOSAKI, A.; KIMURA, Y.; DE HOON, M. J. L.; HAYASHIZAKI, Y.; BROMBACHER, F.; SUZUKI, H. Batf2/irf1 induces inflammatory responses in classically activated macrophages, lipopolysaccharides, and mycobacterial infection. *The Journal of Immunology*, v. 194, n. 12, p. 6035–6044, may 2015.
- 137 SEPEHRI, Z.; KIANI, Z.; KOHAN, F.; GHAVAMI, S. Toll-like receptor 4 as an immune receptor Against Mycobacterium tuberculosis: A systematic review. *Laboratory Medicine*, v. 50, n. 2, p. 117–129, aug 2019.
- 138 DE ARAÚJO STEFANI, M. M. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. suppl 2, p. 89–94, 2008.
- 139 SOUZA, M. L. M. D.; LOPES, G. A.; BRANCO, A. C.; FAIRLEY, J. K.; FRAGA, L. A. D. O. Leprosy screening based on artificial intelligence: Development of a cross-platform app. *JMIR mHealth and uHealth*, v. 9, n. 4, p. e23718, apr 2021.
- 140 DE OLIVEIRA NEVES, D. C.; RIBEIRO, C. D. T.; E SANTOS, L. E. S.; DA COSTA LOBATO, D. Tendência das taxas de detecção de hanseníase em jovens de 10 a 19 anos de idade nas regiões de integração do estado do Pará, Brasil, no período de 2005 a 2014. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 8, n. 1, p. 29–37, apr 2017.
- 141 BRODIE, M.; PLINER, E.; HO, A.; LI, K.; CHEN, Z.; GANDEVIA, S.; LORD, S. Big data vs accurate data in health research: Large-scale physical activity monitoring, smartphones, wearable devices and risk of unconscious bias. *Medical Hypotheses*, v. 119, p. 32–36, oct 2018.
- 142 *Exploring monte carlo methods*. Elsevier, 2012.
- 143 DUAN, Y.; LV, Y.; LIU, Y.-L.; WANG, F.-Y. An efficient realization of deep learning for traffic data imputation. *Transportation Research Part C: Emerging Technologies*, v. 72, p. 168–181, nov 2016.

ANEXO A – Questionário clínico e sócio-demográfico aplicado aos pacientes do projeto.

HANSENÍASE, PARASITOSE E DEFICIÊNCIA DE MICRONUTRIENTES1. Caso 2. Contato Domiciliar 3. Controle Negativo Data: ____/____/____

2. Você já teve Hanseníase? 1. Não 2. Sim
3. Data de nascimento: ____/____/____ 4. Idade (anos completos): _____
5. Gênero: 1. Masculino 2. Feminino
6. Cor da pele(etnia)
1. branca 2. preta 3. amarela 4. parda 5. indígena 99. Não respondeu/não soube informar
7. Município: _____ () Zona rural () Zona urbana ESF: _____
8. Endereço: _____ nº _____ Complemento: _____
9. Telefones: (____) ____ - _____ (residencial) (____) ____ - _____ (Celular)
10. Há quanto tempo você mora neste município? 1. < de 1 ano 2. 1 a 5 anos 3. > de 5 anos
11. Entrevistador: _____
12. Examinador: _____

CARACTERÍSTICAS SOCIOECONÔMICAS

13. Até que série o sr(a) estudou?
1. Ensino superior 2. Ensino médio 3. Ensino Fundamental
4. nunca estudou 88. Não se aplica 99. Não respondeu/Não soube informar
14. Qual seu estado civil?
1. Solteiro(a) 2. Casado(a)/União Estável 3. Separado/ Divorciado(a)
4. Viúvo(a) 99. Não respondeu/ Não soube informar
15. Qual é sua ocupação / trabalho?
0. Do lar 1. Trabalhador rural 2. Serviços domésticos 3. Estudante
4. Serviços de nível médio ou especializado (comércio, prefeitura, agente de saúde, técnico, professor)
5. Aposentado ou Pensionista 6. Desempregado 7. Outros (autônomo) _____
88. Não se aplica 99. Não respondeu/ Não soube informar
16. No caso de aposentado, isto se deve a complicações relacionadas com a Hanseníase (pergunta para caso índice)?
1. Não 2. Sim 88. Não se aplica 99. Não respondeu/ Não soube informar
16. Se sim, quais complicações?
1. Fraqueza 2. Deformidade 3. Dormência 4. Outros: _____
17. Qual a renda mensal familiar? (Salário Mínimo = R\$937,00)
1. menor que 1 Salário Mínimo 2. 1 a 3 Salários Mínimos
3. entre 3 e 5 Salários Mínimos 4. mais que 5 Salários Mínimos
99. Não respondeu/ Não soube informar
18. Contando com você, quantas pessoas vivem na casa? _____

RELAÇÃO FAMILIAR

19. Quem são as pessoas que moram com você, em sua casa? Registrar o **nome completo e grau de parentesco** das pessoas:
- Nome: _____ Grau de Parentesco: _____ Idade: _____
- Nome: _____ Grau de Parentesco: _____ Idade: _____
- Nome: _____ Grau de Parentesco: _____ Idade: _____
- Nome: _____ Grau de Parentesco: _____ Idade: _____
- Nome: _____ Grau de Parentesco: _____ Idade: _____
88. Não se aplica 99. Não respondeu/ Não soube informar

20. Alguém na família já teve hanseníase (PASSADO)?

1.() Sim 0.() Não 99.() Não respondeu/ Não soube informar

21. E hoje, tem alguém que mora ou convive com você que tem hanseníase?

1.() Sim 0.() Não 88.() Não se aplica 99.() Não respondeu/ Não soube informar

22. Se sim, quantas?

1.() Uma 2.() Duas 3.() Três 4.() Quatro ou mais 88.() Não se aplica 99.() Não resp./Não soube informar

23. Qual(is) o(s) nome(s) da(s) pessoa(s) que mora(m) em sua casa ou convive(m) com você que tem hanseníase :

24. Qual o seu grau de parentesco com o(s) caso? _____

88.() Não se aplica

CONHECIMENTO SOBRE A HANSENÍASE

25. Você sabe como se pega a Hanseníase? 0.() Não 1.() Sim

26. Se sim, explique como se pega a Hanseníase: Pode assinalar mais de 1 opção

1.() pelo ar 2.() pelo contato 3.() por gotículas 4.() Outros _____

88.() Não se aplica 99.() Não respondeu/ Não soube informar

27. Você sabe quais são os sintomas da Hanseníase? 0.() Não 1.() Sim

27a. **Se sim**, quais são os sintomas da Hanseníase? Pode assinalar mais de 1 opção

1.() Manchas pelo corpo 2.() Dormência/perda de sensibilidade no local da mancha 3.() Nódulos 4.() Ferida

5.() Deformidade em alguma parte do corpo 88.() Não se aplica 99.() Não respondeu/ Não soube informar

28. Número de Cicatrizes de BCG (verificar nos braços)

0.() Nenhuma cicatriz 1.() 1 cicatriz 2.() 2 Cicatrizes 3.() Não verificado 4.() Outros _____

Caso marque nº 3: justificar o motivo: _____

INFECÇÕES PARASITÁRIAS

29. Você se lembra de alguma verminose que você teve no passado?

0.() Não 1.() Sim 88.() Não se aplica 99.() Não respondeu/ Não soube informar

29a. Se sim, você poderia apontar o possível verme? Pode assinalar mais de 1 opção 88.() Não se aplica

0.() Loimbriga 1.() Schistose 2.() A mareião 3.() Tenia 4.() Oxirus 5.() Giardia

5.() A meba 7.() Outros (especificar): _____ 99.() Não respondeu/ Não soube informar

30. Você já tomou remédio para verme? 0.() Não 1.() Sim

99.() Não respondeu/ Não soube informar

31. Qual é a sua fonte regular de água?

1.() Água encanada 2.() Lagoa, rio, córrego 3.() Água de chuva 4.() Poço, sistema

5. Outros (especificar): _____ 99.() Não respondeu/ Não soube informar

32. Você trata ou filtra a água para beber?

0.() Não 1.() Sim 99.() Não respondeu/ Não soube informar

33. Como é o sistema de esgoto da sua casa? 1.() Esgoto encanado 2.() Esgoto sem encanamento 3.() Não há

sistema de esgoto. 4.() Fossa. 5. Outros (especificar): _____ 99.() Não respondeu/ Não soube informar

34. Você higieniza (lava) suas frutas e legumes antes de cozinhar e servir?

0.() Não 1.() Sim 99.() Não respondeu/ Não soube informar

35. Como você higieniza as verduras ?

1.() Lava as folhas em água da torneira 2.() Lava as folhas e mergulha no vinagre 3.() Não lavo

4.() Lava as folhas e mergulha na água contendo cloro (água sanitária) 5. Outro (especificar): _____

99.() Não respondeu/ Não soube informar

36. Você tem o hábito de lavar as mãos antes das refeições?

1.() Sempre 2.() Às vezes 3.() Não lavo 99.() Não respondeu/ Não soube informar

37. Existe algum animal doméstico em sua casa?

0.() Não 1.() Sim 99.() Não respondeu/ Não soube informar

37a. Se sim, qual(is)? _____

38. Você realiza algum tipo de atividade de trabalho e/ou lazer em contato com água de rios, lagos, ribeirão, córregos, poços e ou outra fonte natural de água?

0.() Não 1.() Sim 99.() Não respondeu/ Não soube informar

38a. Se sim, que tipo de atividade? _____

AVALIAÇÃO DERMATONEUROLÓGICA

39. Presença de Lesões na Pele? 0.() Não 1.() Sim 2. Quantas _____

40a. Presença de Lesões foveolar? 0.() Não 1.() Sim 2. Quantas _____

40b. Características das Lesões:

1. Manchas hipocrômicas?	0.() Não	1.() Sim	2. Quantas _____	3.() Ignorado
2. Áreas referidas hipo/anestésicas?	0.() Não	1.() Sim	2. Quantas _____	3.() Ignorado
3. Placas (lesões planas > 1cm)?	0.() Não	1.() Sim	2. Quantas _____	3.() Ignorado
4. Pápulas (pequenas elevações < 1cm)	0.() Não	1.() Sim	2. Quantas _____	3.() Ignorado
5. Nódulos (lesões palpáveis > 1cm) ?	0.() Não	1.() Sim	2. Quantas _____	3.() Ignorado
6. Infiltrações difusas?	0.() Não	1.() Sim	2. Quantas _____	3.() Ignorado
7. Espessamento Neural?	0.() Não	1.() Sim	2. Quantas _____	3.() Ignorado

4. Local _____

41. Avaliação da face (Nariz):

1. Possui queixa?	0.() Não	1.() Sim	Qual? _____
2. Ressecamento?	0.() Não	1.() Sim	
3. Ferida?	0.() Não	1.() Sim	
4. Perfuração do Septo?	0.() Não	1.() Sim	

42. Avaliação da face (Olhos):

Possui queixa?	0.() Não	1.() Sim	Qual? _____
	Olho Direito		Olho Esquerdo
Fecha os olhos s/ força (mm)?	0.() Não	1.() Sim	0.() Não 1.() Sim
Fecha olhos c/ força (mm)?	0.() Não	1.() Sim	0.() Não 1.() Sim
Triquíase (S/N) / Ectrópico (S/N)?	0.() Não	1.() Sim	0.() Não 1.() Sim
Dimin. sensib. córnea (S/N)?	0.() Não	1.() Sim	0.() Não 1.() Sim
Opacidade córnea (S/N)?	0.() Não	1.() Sim	0.() Não 1.() Sim
Acuidade visual?	() Normal	() Alterada	() Normal () Alterada

43. Força Membros Superiores (MSD= Membro Sup. Direito / MSE= Membro Sup. Esquerdo)

Abrir dedo mínimo - Abdução do 5º (dedo ulnar)

MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado

Elevar o polegar- Abdução do polegar (nervo mediano)

MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado

Elevar o punho - Extensão do punho (nervo radial)

MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado

44. Avaliação Sensitiva - Membros Superiores – Marcar com caneta, conforme avaliação com monofilamento

D		E		CADA FILAMENTO CORRESPONDE A UM NÍVEL FUNCIONAL REPRESENTADO POR UMA COR	
				Verde	● 0,05 g - sensibilidade normal na mão e no pé
				Azul	● 0,2 g - sensibilidade diminuída na mão e normal no pé - dificuldade para discriminar textura (tato leve)
				Violeta	● 2,0 g - sensibilidade protetora diminuída na mão - incapacidade de discriminar textura - dificuldade para discriminar formas e temperatura
				Vermelho (fechado)	● 4,0 g - perda da sensibilidade protetora na mão e às vezes no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
				Vermelho (marcar com x)	⊗ 10 g - perda da sensibilidade protetora no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
				Vermelho (circular)	○ 300 g - permanece apenas a sensação de pressão profunda na mão e no pé
				Preto	● - sem resposta - perda da sensação de pressão profunda na mão e no pé

45. Força Membros Inferiores (MID=Membro Inf. Direito / MIE=Membro Inf. Esquerdo)

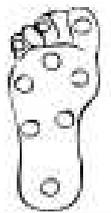
Extensão do Hálux

MSD			MSE		
<input type="checkbox"/> Forte	<input type="checkbox"/> Diminuída	<input type="checkbox"/> Paralisado	<input type="checkbox"/> Forte	<input type="checkbox"/> Diminuída	<input type="checkbox"/> Paralisado

Dorsiflexão do pé

MSD			MSE		
<input type="checkbox"/> Forte	<input type="checkbox"/> Diminuída	<input type="checkbox"/> Paralisado	<input type="checkbox"/> Forte	<input type="checkbox"/> Diminuída	<input type="checkbox"/> Paralisado

46. Avaliação Sensitiva Membros Inferiores – Marcar com caneta, conforme avaliação com monofilamento

D		E		CADA FILAMENTO CORRESPONDE A UM NÍVEL FUNCIONAL REPRESENTADO POR UMA COR	
				Verde	● 0,05 g - sensibilidade normal na mão e no pé
				Azul	● 0,2 g - sensibilidade diminuída na mão e normal no pé - dificuldade para discriminar textura (tato leve)
				Violeta	● 2,0 g - sensibilidade protetora diminuída na mão - incapacidade de discriminar textura - dificuldade para discriminar formas e temperatura
				Vermelho (fechado)	● 4,0 g - perda da sensibilidade protetora na mão e às vezes no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
				Vermelho (marcar com x)	⊗ 10 g - perda da sensibilidade protetora no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
				Vermelho (circular)	○ 300 g - permanece apenas a sensação de pressão profunda na mão e no pé
				Preto	● - sem resposta - perda da sensação de pressão profunda na mão e no pé

47. Forma Clínica (Classificação de Madri)

1.() Indeterminada 2.() Tuberculóide 3.() Dimorfa 4.() Virchowiana 88.() Não se Aplica 77.() Não informado

48. Classificação Operacional baseado no exame clínico:

1.() Paucibacilar 2.() Multibacilar 88.() Não se Aplica 77.() Não informado

49. Grau de Incapacidade Física:

1.() Grau Zero 2.() Grau 1 3.() Grau 2 77.() Não se Aplica

50. Avaliação Concluída: 1.() Sim 0.() Não

Se não concluída, por quê? _____
Observações: _____

51. Classificação: 1.() Caso 2.() Contato Domiciliar 3.() Controle

**ANEXO B – Parecer consubstanciado no Comitê de Ética em Pesquisa da
UFJF.**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Suscetibilidade e evolução clínica da Hanseníase baseados em inteligência artificial

Pesquisador: Cibele Velloso Rodrigues

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 71057317.5.0000.5147

Instituição Proponente: Universidade Federal de Juiz de Fora - ICB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.368.913

Apresentação do Projeto:

O estudo proposto será retrospectivo, e de acompanhamento do tipo caso-controle, Será utilizada a estratégia de busca ativa e análise baseada em famílias residentes na região leste de Minas Gerais, esperando totalizar cerca de 500 indivíduos: cerca de 150 casos-classificados como doentes (multibacilares e paucibacilares) e 350 contatos intradomiciliares (caso-controle proporção de 1;;2-3). Inicialmente serão priorizados os domicílios de pessoas que tem história de hanseníase na família. Após o fechamento do diagnóstico de hanseníase, o paciente será submetido ao tratamento de responsabilidade da equipe da ESF/Limeira de Mantena. Para cada novo caso de hanseníase identificado pelo sistema de saúde do município, serão selecionados controles intra domiciliares e extradomiciliares. Tanto pacientes como controles, depois de considerados os critérios de inclusão e exclusão, serão apresentados à proposta do estudo. Apresentação do projeto está clara, detalhada de forma objetiva, descreve as bases científicas que justificam o estudo, estando de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, item III.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Validar um algoritmo de suscetibilidade e gravidade clínica da hanseníase a partir de marcadores

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 2.368.913

genéticos de risco associados a variáveis clínicas, imunológicas e temporais.

Objetivo Secundário:

- 1- Verificar a existência de associação entre marcadores do tipo polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) através de estudo caso-controle composto por contatos que adoeceram e outros contatos domiciliares e extradomiciliares (contatos sociais ou controles negativos) que não adoeceram ao longo de um período de acompanhamento.
- 2- Analisar parâmetros imunológicos nos pacientes com hanseníase e nos contatos.
- 3- Verificar se há associação entre os polimorfismos genéticos e as variáveis imunológicas e clínicas da hanseníase e sua evolução.
- 4- Elaborar modelos estatísticos gerando um algoritmo que possam refletir a interação entre os diferentes marcadores associados e que posteriormente sejam correlacionados aos parâmetros clínicos.

Os Objetivos da pesquisa estão claros bem delineados, apresenta clareza e compatibilidade com a proposta, tendo adequação da metodologia aos objetivos pretendido, de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013, item 3.4.1 - 4.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo será realizado com a máxima atenção à segurança do participante e dos pesquisadores, à confidencialidade e sigilo dos resultados e dados coletados. Para garantir a segurança dos participantes do estudo, os pesquisadores as coletas de materiais biológicos serão realizadas por profissionais capacitados e serão utilizados materiais estéreis apropriados. A possibilidade também de riscos na coleta de sangue podendo haver dor local, podendo em alguns casos levar a formação de hematomas no local da injeção da agulha. Estas manchas desaparecerem em alguns dias. A coleta será realizada de modo mais confortável possível. A coleta de raspado da pele pode trazer ardência e dor no local da coleta. Após algumas horas ou poucos dias a pele cicatriza sem necessidade de uso de qualquer medicamento. Para a biópsia da pele, algumas pessoas (menos de uma em 10.000) são alérgicas a este tipo de injeção (anestésico). Se a pessoa for alérgica ela pode ter vermelhidão no local de injeção, coceira, erupção na pele, ou muito raramente dificuldade para respirar. Infecção pode ocorrer, mas não é comum. O participante será antes perguntado se sabe se é alérgico ao anestésico. Em caso positivo, ela será dispensada desta coleta de material biológico. Entretanto, como todo o procedimento será realizado no posto de Saúde com a presença de médicos e enfermeiros da equipe, qualquer reação adversa será encaminhada para cuidados médicos no próprio local ou em hospital da região pela equipe de pesquisa. Assim, ao participante fica

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 2.368.913

garantido pela equipe o tratamento em casos de reações adversas e/ou infecções decorrentes da coleta do material biológico. O risco de quebra de confidencialidade será evitado com a utilização de códigos alfanuméricos para identificar as amostras coletadas, e as informações coletadas da entrevista, bem como os resultados incluídos no banco de dados estarão em um único computador com acesso protegido por senha onde somente os pesquisadores terão acesso.

Na entrevista sobre os dados familiares (historia familiar) e coleta de dados de saúde e vacinação haverá a possibilidade de interrupção ou cancelamento caso solicitado pelo sujeito da pesquisa. A análise dos resultados poderá trazer novos conhecimentos científicos de como a hanseníase se desenvolve e sugerir novas formas de melhorar o tratamento e impedir o aparecimento de casos novos na população. O projeto de pesquisa também contribui para educação formal e formação de recursos humanos. Identificação dos riscos e as possibilidades de desconfortos e benefícios esperados, estão adequadamente descritos. A avaliação dos Riscos e Benefícios estão de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, itens III; III.2 e V.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo de pesquisa está em configuração adequada, apresenta FOLHA DE ROSTO devidamente preenchida, com o título em português, identifica o patrocinador pela pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra a; e 3.4.1 item 16. Apresenta o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO em linguagem clara para compreensão dos participantes, apresenta justificativa e objetivo, campo para identificação do participante, descreve de forma suficiente os procedimentos, informa que uma das vias do TCLE será entregue aos participantes, assegura a liberdade do participante recusar ou retirar o consentimento sem penalidades, garante sigilo e anonimato, explicita riscos e desconfortos esperados, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, contato do pesquisador e do CEP e informa que os dados da pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador pelo período de cinco anos, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466 de 2012, itens: IV letra b; IV.3 letras a,b,d,e,f,g e h; IV. 5 letra d e XI.2 letra f. Apresenta o INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS de forma pertinente aos objetivos delineados e preserva os

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 2.368.913

participantes da pesquisa. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas no Manual Operacional para CPEs. Apresenta DECLARAÇÃO de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra h.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS. Data prevista para o término da pesquisa: Agosto de 2022.

Considerações Finais a critério do CEP:

Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na nas Resoluções. 466/12, 441/11 e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS e a Portaria 2201/11 do CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_880345.pdf	06/11/2017 18:18:31		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoinfraestrutura.pdf	06/11/2017 17:43:37	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermoASSENTIMENTOBIOREPOSITO RIOMENORhansenias2017.docx	06/11/2017 16:01:43	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEBIOREPOSITORIORESPONSABLEMENORhansenias2017.docx	06/11/2017 16:00:03	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLEBIOREPOSITORIOADULTOSHansenias2017.docx	06/11/2017 15:59:40	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 2.368.913

Justificativa de Ausência	TCLEBIOREPOSITORIOADULTOSHanseniasiase2017.docx	06/11/2017 15:59:40	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	oficioMantena.pdf	22/09/2017 21:46:00	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEPUFJFHANSENIASEversao2.pdf	22/09/2017 21:36:48	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito
Folha de Rosto	FOLHAROSTOHANSENIASE.pdf	05/07/2017 09:52:35	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito
Outros	QUESTIONARIOHANSENIASEhistoriafamiliar.pdf	25/06/2017 18:31:47	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracaobiorepositorio.pdf	25/06/2017 18:28:30	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termoconfidencailidadedesigilo.pdf	23/06/2017 11:03:58	Cibele Velloso Rodrigues	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JUIZ DE FORA, 07 de Novembro de 2017

Assinado por:
Patrícia Aparecida Fontes Vieira
 (Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br

ANEXO C – Termos de consentimento e assentimento livre e esclarecido aplicados na pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

BIOREPOSITÓRIO

(para maiores de 18 anos)

O(a) Sr.(a), _____, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa "**Suscetibilidade e evolução clínica da Hanseníase baseados em inteligência artificial**". Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte dos materiais biológicos retirados do sangue e da pele cujas utilizações estarão vinculadas somente a esse projeto de pesquisa. Eventualmente seu material biológico poderá ser utilizado futuramente em outro projeto de pesquisa, porém, neste caso, você será novamente contatado para dar consentimento sobre esta utilização.

O motivo que nos leva a estudar a hanseníase, uma doença causada por um micróbio (bactéria), baseia-se no aparecimento de casos novos nas cidades. Nesta pesquisa pretendemos entender porque algumas pessoas, tendo contato com as pessoas que têm hanseníase, podem desenvolver a doença e outras não e também porque algumas pessoas que tem a hanseníase apresentam sintomas clínicos diferentes.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos:

1. Será realizado o exame clínico, por médicos e outros profissionais da saúde previamente treinados. Durante o exame clínico, será aplicado um questionário, com perguntas a respeito da hanseníase, dados pessoais e será aplicada uma entrevista para desenhar um gráfico, chamado genograma, onde estarão indicados todos os membros da família e todas as pessoas que moram juntas.
2. Serão realizados testes no sangue para auxiliar no diagnóstico da doença. Para estes testes iremos coletar 10 mL de sangue da veia do seu braço. O sangue coletado por profissional treinado será levado aos laboratórios de Imunologia e Biologia celular e genética molecular para fazer testes para procurar substâncias de defesa (anticorpos, citocinas etc) e de material genético (DNA) que irão mostrar como o seu organismo se defende contra o micróbio que causa a hanseníase. O teste genético pode mostrar se existem características hereditárias que estejam relacionadas ao desenvolvimento ou não da hanseníase.
3. O raspado da pele quando necessário, será coletado para ver se o micróbio está presente. A coleta de raspado da pele será feita no lóbulo da orelha, do cotovelo e/ou da mancha na pele com a utilização de um instrumento que raspa a pele.

O sangue ficará guardado em tubo, armazenados em freezer na temperatura de -20°C a -86°C, no **Biorepositório** do laboratório de Biologia Celular e Genética Molecular da UFJF - campus Governador Valadares.

Os riscos envolvidos na pesquisa são: a coleta de material biológico será realizada de modo seguro com materiais descartáveis e o mais confortável possível. Na coleta de sangue pode haver leve dor local, podendo em alguns casos levar a formação de manchas roxas (hematomas) no local da entrada da agulha. Estas manchas desaparecerem em alguns dias. A coleta de raspado da pele pode trazer ardência e dor no local da coleta. Após algumas horas ou poucos dias a pele cicatriza sem necessidade de qualquer medicamento. Para a biópsia da pele, algumas pessoas (menos de uma em 10.000) são alérgicas a este tipo de injeção (anestésico). Em caso de alergia poderá ocorrer os sintomas: vermelhidão no local de injeção, coceira, erupção na pele, ou muito raramente dificuldade para respirar. Infecção pode ocorrer, mas não é comum. Todos os procedimentos serão realizados no posto de Saúde com a presença de médicos e enfermeiros da equipe, qualquer reação adversa será encaminhada para cuidados médicos no próprio local ou em hospital da região pela equipe de pesquisa. Assim, ao participante fica garantido pela equipe o tratamento em casos de reações adversas e/ou infecções decorrentes da coleta do material biológico. Os benefícios da pesquisa virão da análise dos resultados que poderão trazer novos

1/2

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFJF
 Campus Universitário da UFJF - Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
 CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

conhecimentos científicos de como a hanseníase se desenvolve e sugerir novas formas de melhorar o tratamento e impedir o aparecimento de casos na população.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a). O pesquisador tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

Este termo de consentimento de duas páginas encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável no Laboratório de Imunologia do campus UFJF-Governador Valadares, e a outra via será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de dez anos e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução N° 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Declaração de consentimento

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ nascido em ___/___/___ com idade de _____ anos, residente no endereço (Rua/Av) _____ N° _____ complemento _____ Bairro _____ Cidade _____ (MG), fone de contato () _____ e () _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa "**Reconhecimento de padrões moleculares, clínicos e imunológicos para criação de algoritmo da suscetibilidade e gravidade clínica da Hanseníase baseados em inteligência artificial.**", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento posso solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desta pesquisa e de outras que possam futuramente ser realizadas com o meu material biológico coletado. Se houver prorrogação ou se outra pesquisa for realizada com este material biológico armazenado no biorrepositório nós entraremos em contato com o(a) Sr(a) para pedir sua autorização. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Governador Valadares, _____ de _____ de 20 ____.

Nome legível e

Assinatura do participante

2/ 2

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:
 CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFJF
 Campus Universitário da UFJF - Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
 CEP: 36036-900
 Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br



Nome legível e

Assinatura do pesquisador

Nome dos Pesquisadores Responsáveis:

Cibele Velloso Rodrigues; Lúcia Alves Fraga e Márcio Luis Moreira de Souza

Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares

Rua Israel Pinheiro, 2000 Bairro Universitários (campus Univale II)

Fone: (33) 991506745 ou (33) 987064570 - E-mail: souza.mlm@gmail.com

3/ 2

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFJF

Campus Universitário da UFJF - Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO/BIOREPOSITÓRIO

(anuência para menores de idade)

Você _____, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa "**Suscetibilidade e evolução clínica da Hanseníase baseados em inteligência artificial**". Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte dos materiais biológicos retirados do sangue e da pele cujas utilizações estarão expressamente vinculadas somente a esse projeto de pesquisa e eventualmente em outros futuros. O motivo que nos leva a estudar a hanseníase, uma doença causada por um micróbio (bactéria), baseia-se no aparecimento de casos novos nas cidades. Nesta pesquisa pretendemos entender porque algumas pessoas, tendo contato com as pessoas que têm hanseníase, podem desenvolver a doença e outras não e também porque algumas pessoas que tem a hanseníase apresentam sintomas clínicos diferentes. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos:

1. Será realizado o exame clínico, por médicos e outros profissionais da saúde previamente treinados. Durante o exame clínico, será aplicado um questionário, com perguntas a respeito da hanseníase, dados pessoais e será aplicada uma entrevista para desenhar um gráfico, chamado genograma, onde estarão indicados todos os membros da família e todas as pessoas que moram juntas.
2. Serão realizados testes no sangue para auxiliar no diagnóstico da doença. Para estes testes iremos coletar 10 mL de sangue da veia do seu braço. O sangue coletado por profissional treinado será levado aos laboratórios de Imunologia e Biologia Celular e Genética Molecular para fazer testes para procurar substâncias de defesa (anticorpos, citocinas etc) e de material genético (DNA) que irão mostrar como o seu organismo se defende contra o micróbio que causa a hanseníase. O teste genético pode mostrar se existem características hereditárias que estejam relacionadas ao desenvolvimento ou não da hanseníase.
3. O raspado da pele, se necessário, será coletado para ver se o micróbio está presente. A coleta de raspado da pele será feita no lóbulo da orelha, do cotovelo e/ou da mancha na pele com a utilização de um instrumento que raspa a pele.

O sangue ficará guardado em tubo, armazenado em freezer na temperatura de -20°C a -86°C, no **Biorepositório** do laboratório de Biologia Celular e Genética Molecular da UFJF - campus Governador Valadares.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Você será esclarecido (a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. O responsável por você poderá, retirar o consentimento de guarda e utilização do material cedido, valendo a desistência a partir da data de formalização desta ou interromper a sua participação a qualquer momento sem quaisquer prejuízos. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material, estarão à sua disposição quando finalizada.

Os riscos envolvidos na pesquisa são: a coleta de material biológico será realizada de modo seguro com materiais descartáveis e o mais confortável possível. Na coleta de sangue pode haver leve dor local, podendo em alguns casos levar a formação de manchas roxas (hematomas) no local da entrada da agulha. Estas manchas desaparecerem em alguns dias. A coleta de raspado da pele pode trazer ardência e dor no local da coleta. Após algumas horas ou poucos dias a pele cicatriza sem necessidade de qualquer medicamento. Para a biópsia da pele, algumas pessoas (menos de uma em 10.000) são alérgicas a este tipo de injeção (anestésico). Em caso de alergia poderá ocorrer os sintomas: vermelhidão no local de

1/2

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFJF
Campus Universitário da UFJF -Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
CEP: 36036-900
Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

injeção, coceira, erupção na pele, ou muito raramente dificuldade para respirar. Infecção pode ocorrer, mas não é comum. Todos os procedimentos serão realizados no posto de Saúde com a presença de médicos e enfermeiros da equipe, qualquer reação adversa será encaminhada para cuidados médicos no próprio local ou em hospital da região pela equipe de pesquisa. Assim, ao participante fica garantido pela equipe o tratamento em casos de reações adversas e/ou infecções decorrentes da coleta do material biológico. Os benefícios da pesquisa virão da análise dos resultados que poderão trazer novos conhecimentos científicos de como a hanseníase se desenvolve e sugerir novas formas de melhorar o tratamento e impedir o aparecimento de casos na população.

Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de dez anos e após esse tempo serão destruídos.

Este termo de assentimento de duas páginas encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável no Laboratório de Imunologia da UFJF-campus Governador Valadares, e a outra via será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Declaração de consentimento

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ nascido em ____/____/____ com idade de _____ anos, residente no endereço _____ (Rua/Av) N.º _____ complemento _____ Bairro _____ Cidade _____ (MG), fone de contato () _____ e () _____, tendo como responsável por mim o Sr(a). _____ fui

informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar.

Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa e quando for o caso e de outras que possam futuramente ser realizadas com o meu material coletado. Você será contatado para consentir, a cada nova pesquisa, sobre a utilização do material biológico armazenado no biorrepositório.

Recebi o termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Governador Valadares, _____ de _____ de 20 ____.

Nome legível e Assinatura do(a) menor

Nome legível e Assinatura do pesquisador

Nome dos Pesquisadores Responsáveis:

Cibele Velloso Rodrigues e Lúcia Alves Fraga e Márcio Luis Moreira de Souza

Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares

2/ 2

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFJF
Campus Universitário da UFJF -Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

 UNIVERSIDADE
FEDERAL DE JUIZ DE FORA **Campus Governador Valadares - Instituto de Ciências da Vida**
Rua Israel Pinheiro, 2000 Bairro Universitários (campus Univale II)
Fone: (33) 991506745 ou (33) 987064570 - E-mail: souza.mlm@gmail.com

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFJF
Campus Universitário da UFJF -Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
CEP: 36036-900
Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO /BIOREPOSITORIO

(para responsável por menor de 18 anos ou legalmente incapaz)

O menor _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa "***Suscetibilidade e evolução clínica da Hanseníase baseados em inteligência artificial***". Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte dos materiais biológicos retirados do sangue e da pele do menor cujas utilizações estarão expressamente vinculadas somente a esse projeto de pesquisa e eventualmente em outros futuros. O motivo que nos leva a estudar a hanseníase, uma doença causada por um micróbio (bactéria), baseia-se no aparecimento de casos novos nas cidades. Nesta pesquisa pretendemos entender porque algumas pessoas tendo contato com as pessoas que têm hanseníase podem desenvolver a doença e outras não e também porque algumas pessoas que tem a hanseníase apresentam formas clínicas diferentes.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos:

1. Será realizado o exame clínico, por médicos e outros profissionais da saúde previamente treinados. Durante o exame clínico, será aplicado um questionário, com perguntas a respeito da hanseníase, dados pessoais e será aplicada uma entrevista para desenhar um gráfico, chamado genograma, onde estarão indicados todos os membros da família e todas as pessoas que moram juntas.
2. Serão realizados testes no sangue para auxiliar no diagnóstico da doença. Para estes testes iremos coletar 10 mL de sangue da veia do seu braço. O sangue coletado por profissional treinado será levado aos laboratórios de Imunologia e Biologia Celular e Genética molecular para fazer testes para procurar substâncias de defesa (anticorpos, citocinas etc) e de material genético (DNA) que irão mostrar como o seu organismo se defende contra o micróbio que causa a hanseníase. O teste genético pode mostrar se existem características hereditárias que estejam relacionadas ao desenvolvimento ou não da hanseníase.
3. O raspado da pele, se necessário, será coletado para ver se o micróbio está presente. A coleta de raspado da pele será feita no lóbulo da orelha, do cotovelo e/ou da mancha na pele com a utilização de um instrumento que raspa a pele.

O sangue ficará guardado em tubo, armazenado em freezer na temperatura de -20°C a -86°C, no **Biorepositório** do laboratório de Biologia Celular e Genética Molecular da UFJF - campus Governador Valadares.

Para participar desta pesquisa, o menor sob sua responsabilidade não terá nenhum custo nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, ele tem assegurado o direito à indenização. Ele será esclarecido (a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. O (a) Sr. (a), como responsável pelo menor, poderá retirar o seu consentimento de guarda e utilização do material cedido, valendo a desistência a partir da data de formalização desta ou interromper a sua participação a qualquer momento sem quaisquer prejuízos. A participação dele é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido (a). O pesquisador irá tratar a identidade do menor com padrões profissionais de sigilo. O menor não será identificado em nenhuma publicação.

Os riscos envolvidos na pesquisa são: a coleta de material biológico será realizada de modo seguro com materiais descartáveis e o mais confortável possível. Na coleta de sangue pode haver leve dor local, podendo em alguns casos levar a formação de manchas roxas (hematomas) no local da entrada da agulha. Estas manchas desaparecerem em alguns dias. A coleta de raspado da pele pode trazer ardência e dor no local da coleta. Após algumas horas ou poucos dias a pele cicatriza sem necessidade de qualquer medicamento. Para a biópsia da pele, algumas pessoas (menos de uma em 10.000) são alérgicas a este

1 de 2

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFJF
Campus Universitário da UFJF -Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

tipo de injeção (anestésico). Em caso de alergia poderá ocorrer os sintomas: vermelhidão no local de injeção, coceira, erupção na pele, ou muito raramente dificuldade para respirar. Infecção pode ocorrer, mas não é comum. Todos os procedimentos serão realizados no posto de Saúde com a presença de médicos e enfermeiros da equipe, qualquer reação adversa será encaminhada para cuidados médicos no próprio local ou em hospital da região pela equipe de pesquisa. Assim, ao participante fica garantido pela equipe o tratamento em casos de reações adversas e/ou infecções decorrentes da coleta do material biológico. Os benefícios da pesquisa virão da análise dos resultados que poderão trazer novos conhecimentos científicos de como a hanseníase se desenvolve e sugerir novas formas de melhorar o tratamento e impedir o aparecimento de casos na população.

Os resultados a partir do material estarão à sua disposição quando finalizada. O nome ou o material que indique a participação do menor não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados no projeto ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de dez anos, e após esse tempo serão destruídos.

Este termo de consentimento de duas páginas encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável no Laboratório de Imunologia do campus UFJF-Governador Valadares, e a outra via será fornecida ao(a) Sr. (a). Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Declaração de consentimento

Eu, _____, portador(a) do documento de identidade _____, grau de parentesco _____, residente no endereço _____ (Rua/Av) N.º _____ complemento _____ Bairro _____ Cidade _____ (MG), fone de contato () _____ e () _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar a decisão do menor sob minha responsabilidade de participar, se assim o desejar. O(a) Sr(a) será contactado para consentir, a cada nova pesquisa, sobre a utilização do material biológico armazenado no biorrepositório.

Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Governador Valadares, _____ de _____ de 20 ____.

Nome legível e Assinatura do participante

Nome legível e Assinatura do pesquisador

Nome dos Pesquisadores Responsáveis:

Cibele Velloso Rodrigues e Lúcia Alves Fraga e Márcio Luis Moreira de Souza

Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares

Rua Israel Pinheiro, 2000 Bairro Universitários (campus Univale II)

2 de 2

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFJF

Campus Universitário da UFJF -Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

 UNIVERSIDADE
FEDERAL DE JUIZ DE FORA Campus Governador Valadares - Instituto de Ciências da Vida

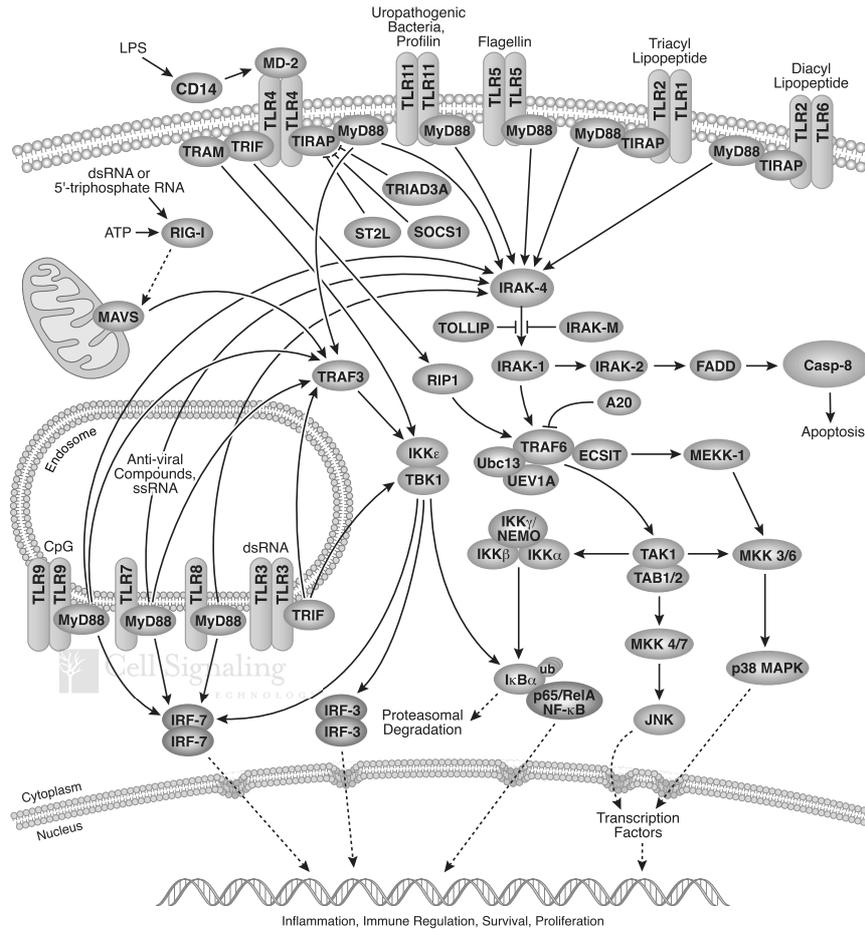
Fone: (33) 991506745 ou (33) 987064570 -E-mail: souza.mlm@gmail.com

3 de 2

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFJF
Campus Universitário da UFJF -Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
CEP: 36036-900
Fone: (32) 2102- 3788 / E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

ANEXO D – Vias de sinalização de alguns TLRs.

Toll-like Receptor Signaling



Pathway Diagram Keys

Kinase	Enzyme	G-protein	Direct Inhibitory Modification	Tentative Inhibitory Modification	Translocation
Phosphatase	pro-apoptotic	Acetylase	Multistep Stimulatory Modification	Separation of Subunits or Cleavage Products	Transcriptional Stimulatory Modification
Transcription Factor	pro-survival	Deacetylase	Multistep Inhibitory Modification	Joining of Subunits	Transcriptional Inhibitory Modification
Caspase	GAP/GEF	Ribosomal subunit	Tentative Stimulatory Modification		
Receptor	GTPase	Direct Stimulatory Modification			

ANEXO E – Carta de concessão do PDSE da CAPES.



Ministry of Education - MEC
 Brazilian Federal Foundation for Support and Evaluation of Graduate Education - CAPES
 Setor Bancário Norte, Quadra 2, Bloco L, Lote 06
 CEP 70.040-031 - Brasília, BRAZIL

Dear Mr.(s),
 MARCIO LUIS MOREIRA DE SOUZA
 Rua Suíça - 173 - Apto 405
 GRÃ-DUQUESA
 Governador Valadares - Minas Gerais
 Brasil
 35.057-670

11/06/2019

Processo: PDSE - 88881.361990/2019-01

TO WHOM IT MAY CONCERN

We hereby certify that Mr./Mrs. **MARCIO LUIS MOREIRA DE SOUZA** has been awarded a scholarship from the CAPES Foundation, an agency under the Ministry of Education of Brazil, in order to conduct part of his doctoral research as a Visiting Student at **UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN DIEGO**.

The scholarship includes:

Grant	Unit Value	Parcels (up to)	Total
Health insurance allowance	US\$ 90.00	12	US\$ 1,080.00
High cost city stipend	US\$ 400.00	12	US\$ 4,800.00
Monthly stipends	US\$ 1,300.00	12	US\$ 15,600.00
Settling-in allowance	US\$ 1,300.00	1	US\$ 1,300.00

*The parcels depend on the period of the scholarship stated below.

- . The scholarship is valid from **11/2019** to **10/2020**.
- . Travel allowance towards the cost of travel for the itinerary: **Brasil/Estados Unidos/Brasil**
- . The benefits granted are linked to the period spent abroad, within the approved period.
- . Capes will not be responsible for costs related to academic and research fees.

Sincerely,

Valéria Cristina Lima Carvalho
 General Coordinator for International Scholarships and Projects
 This document is public and does not need signature recognition
 - Article 19, interpolated proposition II, Federal Constitution of Brazil.

In order to validate the authentication of this document, please visit the website <http://validadocumentos.capes.gov.br/> and enter the following code: **2F+dzJqwART4=**