



Data de Submissão: 30/03/2017  
Data de Aprovação: 25/04/2017

ARTÍCULO ORIGINAL

## Utilización de biomarcadores en tuberculosis pediátrica

### *Use of biomarkers in pediatric tuberculosis*

Christiane Mello Schmidt<sup>1</sup>, Adriano Queiroz<sup>2</sup>, Claudete Aparecida Araújo Cardoso<sup>3</sup>

#### Palabras-clave:

Biomarcadores  
Farmacológicos,  
Tuberculosis,  
Niño.

#### Resumen

En el presente artículo son revisados el concepto de biomarcadores y biofirma (*biosignature*) y su potencial uso en la tuberculosis pediátrica, con aplicación en el desarrollo de nuevas vacunas y de nuevos métodos de laboratorios que permiten el diagnóstico más preciso y la evaluación de la respuesta al tratamiento. Se enfatizan también los métodos que incluyen la dosificación de anticuerpos, citocinas, transcriptomas, proteomas y metabolomas.

#### Keywords:

Biomarkers,  
Pharmacological,  
Tuberculosis,  
Child.

#### Abstract

In this article, we review the concept of biomarkers and biosignature and their potential use in pediatric tuberculosis, with application in the development of new vaccines and new laboratory methods that allow a more accurate diagnosis and evaluation of the response to treatment. Emphasis is also given to methods which include the dosage of antibodies, cytokines, transcriptomics, proteomics and metabolomics.

<sup>1</sup> Licenciatura en Salud del Niño y del Adolescente - Profesora Asistente en Pediatría del Departamento Materno Infantil de la Facultad de Medicina de la Universidad Federal Fluminense.

<sup>2</sup> Postdoctorado en Salud Pública - Investigador del Centro de Investigación Gonçalo Moniz/FIOCRUZ - CPQGM/FIOCRUZ.

<sup>3</sup> Postdoctorado en Salud Pública - Profesora Adjunta en Pediatría del Departamento Materno Infantil de la Facultad de Medicina de la Universidad Federal Fluminense.

#### Dirección:

Claudete Aparecida Araújo Cardoso.

Universidade Federal Fluminense. Av. Marquês do Paraná, nº 303, Centro. Niterói - RJ. Brasil. CEP: 24033-900. E-mail: claudetecardoso@id.uff.br

## INTRODUCCIÓN

---

La tuberculosis (TB), cuyo agente etiológico identificado en 1882 es el *Mycobacterium tuberculosis*, todavía representa un desafío para la salud pública en todo el mundo<sup>1,2</sup>. Las dificultades para mejorar el control de esta enfermedad están relacionadas con la pobreza, en la tardanza del diagnóstico de casos con TB activa, la falta de adhesión al tratamiento, la infección por cepas resistentes, la coinfección por el VIH, al control inadecuado de los infectados y el no tratamiento de los casos de infección latente por la TB (ILTB)<sup>1</sup>.

Desde el punto de vista pediátrico, el diagnóstico de la TB pulmonar se constituye en un desafío en la práctica clínica, una vez que los niños pueden presentar signos, síntomas clínicos y alteraciones radiológicas inespecíficas. En esta franja etaria, las lesiones secundarias de la TB comúnmente son paucibacilares, tornando difícil el aislamiento de la bacteria. Se suma a este aislamiento difícil el hecho de que los niños no consiguen expectorar. Además, el riesgo de enfermarse es mayor en los dos primeros años de la infección y los niños menores de cinco años son más vulnerables para desarrollar formas graves de la enfermedad<sup>3</sup>.

La TB en los niños puede ser clasificada como TB confirmada, TB no confirmada y TB improbable. La TB confirmada es aquella en la que el resultado de la cultura para el *M. tuberculosis* y/o del análisis rápido molecular para la investigación del DNA bacteriano fueran positivos. En la TB no confirmada, no hubo la confirmación bacteriológica y los individuos tuvieron al menos dos de los siguientes hallazgos: síntomas o la radiografía de tórax con hallazgos sugestivos de TB, historial de contacto para TB, evidencia o no de infección por el *M. tuberculosis* y adecuada respuesta al tratamiento específico. Se entiende por evidencia de infección para la TB, al resultado positivo de la prueba de tuberculínica y/o la dosificación de interferon gamma (Igras). En los casos de TB improbable, los pacientes no tuvieron la confirmación bacteriológica ni se encajan en los criterios de la TB no confirmada<sup>4</sup>.

Esta clasificación, recientemente propuesta por Graham et al (2015), incluso para la uniformización de la clasificación de los casos en estudios con TB pediátrica, demuestra la dificultad que todavía tenemos en la definición de estos casos y como nuevos métodos de diagnósticos pueden contribuir para la confirmación de casos de TB con bacteriología negativa, evitando así el tratamiento innecesario de estos pacientes. De la misma forma, el control de laboratorio de la respuesta al tratamiento en los pacientes con TB no confirmada o improbable presenta limitaciones. Los casos de TB extra pulmonar también acostumbra ser paucibacilares<sup>5</sup>. Estas situaciones en las que no existe la confirmación bacteriológica se constituyen aún en un desafío para la práctica clínica pediátrica.

Hasta el momento, distinguir entre ILTB y TB activa puede ser difícil y los métodos de laboratorios disponibles

como la prueba de tuberculínica y la dosificación de interferon gamma no permiten esta diferenciación<sup>6</sup>. Identificar estas dos situaciones es fundamental. Primero, el diagnóstico de ILTB, en donde el paciente está infectado y no presenta signos y síntomas de TB pulmonar o extra pulmonar, permite el uso de apenas un fármaco, la isoniazida, por seis meses, conforme a lo indicado actualmente por el Ministerio de Salud<sup>7</sup>.

Tal medida disminuye el riesgo de enfermedad del paciente. Además, la dificultad en identificar las dos situaciones puede conllevar al tratamiento equivocado de un caso de ILTB con tres o cuatro medicamentos, dependiendo de la edad del paciente y también al uso de la monoterapia, con isoniazida para los casos de TB activa. Ambos tratamientos, cuando son realizados de manera equivocada, contribuyen para la elevación de morbilidad de la población afectada.

Todavía actualmente, la vacuna BCG, disponible para el uso en dosis única en los niños en el nacimiento, protege apenas contra las formas diseminadas de la enfermedad (TB miliar y meningoencefalitis tuberculosa), con una protección que no sobrepasa el 80%<sup>8</sup>.

En este contexto, el mejor conocimiento de las características biológicas del agente etiológico, como también su interacción con el hospedero a través de la mensuración de biomarcadores, pueden promover el desarrollo de nuevos métodos de laboratorios que puedan contribuir para la respuesta de estos desafíos y consecuentemente en el mejor control de la enfermedad.

## BIOMARCADORES Y BIOFIRMA: DEFINICIÓN

---

Los biomarcadores son definidos como moléculas que poseen la característica de medir y expresar un proceso biológico normal, un proceso patogénico y también la respuesta terapéutica para la intervención farmacológica<sup>9,10</sup>. El biomarcador puede ser originario del patógeno o del hospedero, pudiendo ser detectado a través de una única medida en una muestra o a través de un estímulo, *in vivo* o *in vitro*. Cuando es característico de una enfermedad, el biomarcador o la *biosignatura* tienen la posibilidad de ser utilizados como pruebas de diagnóstico<sup>9</sup>.

La biofirma es definida como un “set” o conjunto de biomarcadores.

En una enfermedad tan compleja como la TB, que todavía presenta tantos desafíos, la dosificación de varios en vez de un biomarcador parece ser más eficaz en el intento de dilucidarlos<sup>11</sup>.

## BIOMARCADORES EN LA TUBERCULOSIS: POTENCIALES DE APLICABILIDAD EN LA PRÁCTICA CLÍNICA PEDIÁTRICA

---

El descubrimiento de nuevos biomarcadores abre una perspectiva para su utilización en diferentes situaciones clínicas de desafío enfrentadas para el mejor control de la TB.

Algunas características son importantes para un buen biomarcador: diferenciar individuos saludables y con TB activa, normalizar con el tratamiento y ser reproducible en diferentes poblaciones con relación al desenlace clínico<sup>10</sup>. Otro aspecto interesante relativo a los biomarcadores es la posibilidad de ser mensurado en otros análisis clínicos tales como el de sangre, orina y aire exhalado entre otros<sup>12</sup>.

El desarrollo de pequeños dispositivos portátiles - una prueba *point of care* - para la dosificación de biomarcadores, en muestras que no sea de esputo - es una necesidad para el atendimento inicial de los pacientes con sospecha de TB. Como en los niños y en los pacientes con coinfección TB/VIH, la calidad del esputo colectado es perjudicada y la sensibilidad de la baciloscopia es baja, una prueba rápida con el potencial de ser realizada en otras muestras y que presente de moderada a elevada sensibilidad y alta especificidad puede ser de gran utilidad<sup>2</sup>.

Todavía desde el punto de vista del diagnóstico, sería interesante un marcador que indicara a aquellos individuos con un mayor riesgo de enfermarse o de evolución del ILTB para TB activa<sup>13</sup>.

Con relación al tratamiento, los biomarcadores pueden ser útiles en la detección de casos con posibilidad de recibir esquemas terapéuticos de menor duración, prever el riesgo de recaída y también evaluar la respuesta al tratamiento<sup>9</sup>.

Para el desarrollo de nuevas vacunas, los biomarcadores poseen el potencial de identificar moléculas más inmunogénicas, cuantificar la reactividad de las células T a los antígenos vacunales y determinar la durabilidad de esta respuesta en relación con la dosis de la vacuna y en cuanto al uso o no de adyuvante<sup>13</sup>.

## LA INTERACCIÓN DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* CON EL HOSPEDERO

La infección por el *M. tuberculosis* desencadena una respuesta inmune humoral, con la síntesis de anticuerpos de varios isotipos (IgA, IgM y IgG) contra los antígenos de las micobacterias y también la respuesta inmune celular, con activación de monocitos, macrófagos y linfocitos<sup>11</sup>. Así, tanto la dosificación de anticuerpos específicos como la de productos liberados por células activadas - enzimas, citocinas, transcriptomas, proteomas y metabolomas - tienen el potencial de ser biomarcadores útiles para el mejor conocimiento del agente etiológico y de su interacción con el hospedero.

Es sabido que existe una compleja interacción entre la epidemiología, el agente infeccioso y el hospedero con relación al desarrollo de la enfermedad. Tal complejidad de interacción se justifica por el hecho de que la respuesta a un cuadro grave infeccioso depende de múltiples factores. El gran desafío se constituye en definir un biomarcador que refleje esta interacción y se constituya en una herramienta que podrá potencialmente desempeñar un papel relevante al diferenciar los niños saludables de aquellos con TB activa, además de

retornar a los niveles normales con la institución de la terapia y ser reproducible en otras poblaciones.

## DOSIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA ANTÍGENOS DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

La dosificación sérica de anticuerpos específicos en los casos de TB pediátrica es estimulante, considerando que este análisis no precisa de la colecta de material del sitio de la infección y puede ser mensurada de forma rápida y con un relativo bajo costo, utilizando dispositivos simples<sup>14,15</sup>.

En la infancia, al evaluar las pruebas de diagnósticos envolviendo la dosificación de inmunoglobulinas, es necesario considerar algunos aspectos del sistema inmune en este grupo etario. En los lactantes y en los niños menores, el sistema inmune todavía se encuentra en desarrollo. Los recién nacidos inicialmente responden a los antígenos con mayor síntesis de IgM. La protección por la IgG se da principalmente por el paso de este isotipo a partir desde la placenta y la IgA es suministrada principalmente a través de la leche materna<sup>16,17</sup>. Los niveles de las inmunoglobulinas IgM, IgG y IgA alcanzan valores próximos a los de adultos a los dos, seis y 10 años respectivamente<sup>18</sup>. Varios estudios referentes al uso de la serología como método de diagnóstico en la TB fueron realizados en adultos<sup>15</sup>. Achkar & Ziegenbalg (2012), realizaron una revisión sobre el tema en Pediatría y encontraron 23 artículos. En esta revisión, fueron encontradas grandes variaciones entre los niveles de anticuerpos; la sensibilidad varió desde 14 al 85% y la especificidad del 86 al 100%.

Los autores destacan dificultades en comparar los resultados entre estos estudios debido a la diferencias en la metodología entre estos, tales como: edad de los pacientes, antígenos distintos (Ag5, "old tuberculina", A60 (ANDA-TB) 16KDA, 30 KDA, 38 KDA, PPD, ESAT-6, TBLG, LOS, DAT, PGBTb1, complejo Ag 85 y CFP 10), isotipo evaluado (IgM, IgG, IgA e IgE), aislados o combinados, uso de kits comerciales o métodos *in house* y tipo de TB presentada por los pacientes en las investigaciones (confirmada, no confirmada e improbable)<sup>4,15</sup>.

En cuanto al tipo de TB, estudios analizando la serología demuestran que, en los pacientes con lesiones cavitadas, y consecuentemente mayor carga bacilar, el nivel de anticuerpos es mayor probablemente debido al mayor estímulo antigénico y mayor respuesta inflamatoria<sup>19,20</sup>. Se resalta que las lesiones cavitadas son hallazgos menos frecuentes en los casos de TB pulmonar en niños cuando se compara con adolescentes y adultos<sup>21</sup>.

Otro aspecto por considerar en relación con el uso de este método en TB pediátrica es la relación de los niveles de anticuerpos anti antígenos de las micobacterias y la vacunación previa con BCG. Estos anticuerpos son influenciados por la edad del niño, tiempo de vacunación con BCG, antígeno e isotipo examinado<sup>15</sup>. Algunos estudios encontraron niveles más

elevados para determinado antígeno cuando se compararon en niños vacunados y no vacunados<sup>22</sup>. No obstante, de un modo general, diversos autores mostraron que el historial previo de vacunación BCG no influencia en los niveles de anticuerpos para los diferentes antígenos examinados<sup>15</sup>.

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS), no recomienda la utilización de pruebas serológicas para el diagnóstico de TB en las diversas franjas etarias<sup>23</sup>.

## CITOCINAS

Las citocinas, secretadas por las células activadas por antígenos del *M. tuberculosis*, poseen el potencial para ser utilizadas como biomarcadores en TB, especialmente en la diferenciación entre ILTB, TB activa y otras enfermedades pulmonares. Para ser potenciales biomarcadores, las moléculas evaluadas deben presentar algunas características como: estar “*upregulated*” en los casos de TB activa cuando fueran comparadas con individuos con ILTB y saludables, y ser secretadas por las células estimuladas específicamente por antígenos específicos del *M. tuberculosis*. Algunas citocinas pueden ser liberadas por macrófagos y células T inespecíficas y presentarse elevadas en varias enfermedades. Estas citocinas ya fueron detectadas en niveles elevados en pacientes con TB: I-309, CXCL9, IL-10, IL-6, IL-7, IL-8, G-CSF, TGF- $\beta$ 1, CCL2, IL2, IL13 e TNF-F  $\alpha$ <sup>24</sup>.

La dosificación de IP- 10 (*interferon gamma inducible protein 10*), viene siendo evaluada en investigaciones relacionadas a la TB pediátrica. Jenum et al (2016), encontraron resultados promisorios evaluando niños en India, cuando asociaron el análisis de esta citocina al interferon gamma<sup>25</sup>.

La comparación entre los resultados de los estudios evaluando citocinas en TB puede ser difícil, porque existen diferencias entre las citocinas y los métodos utilizados para identificarlas<sup>24</sup>.

La dosificación de la citocina interferon-gamma (Igras) se encuentra disponible comercialmente para el uso en la práctica clínica. Tiene la ventaja de no sufrir la interferencia de la vacunación BCG ni al contacto previo con otras micobacterias. No obstante, este método de laboratorio no permite la diferenciación entre ILTB y TB activa. En niños menores de dos años este método presenta limitaciones<sup>6</sup>. En Brasil, no está disponible para el uso en las unidades públicas de salud.

## TRANSCRIPTOMAS

La lectura del mapa de ADN resulta en moléculas de RNA -los transcritos. La colección de transcritos es denominada como transcriptoma. La evaluación de los transcriptomas permite analizar en una célula cuales genes están o no activados en las diversas circunstancias. La mayoría de los transcritos están formados de RNA mensajero que están directamente relacionados a la síntesis de proteínas<sup>26</sup>.

Un estudio prospectivo, realizado en niños con sospecha de TB, infectados o no por el VIH, en Sudáfrica, Malawi y Kenia, identificó una biofirma de 51 transcritos, que posibilitó la diferenciación entre TB y otras enfermedades. La sensibilidad fue del 82,9% y la especificidad del 83,6%, para el diagnóstico en los pacientes con TB confirmada por cultura. La sensibilidad fue del 62,5 a 82,3%, 42,1% a 80,8% y 35,3 a 79,6% en los niños con TB altamente probable, probable o posible respectivamente, pero con la cultura negativa<sup>27</sup>.

## PROTEOMAS

El conjunto de proteínas expresado por determinada célula, en las diversas situaciones, se denomina proteoma. Inicialmente, las proteínas del *M. tuberculosis* fueron identificadas a través de métodos inmunológicos y bioquímicos. A partir de los años 90, nuevas tecnologías como la electroforesis 2-D y la espectrometría de masa vienen permitiendo la identificación de diversas proteínas de este microorganismo<sup>28</sup>.

El análisis de diferentes componentes celulares puede identificar marcadores inmunogénicos, de virulencia, de estado de latencia o actividad, que pueden tener utilidad en el desarrollo de nuevas vacunas, drogas y herramientas para un diagnóstico más preciso para la TB<sup>28</sup>.

Algunos ejemplos de proteínas, entre otras, ya aisladas: Rv0899, que permite la sobrevivencia de la bacteria en pH bajo, Rv2246, involucrada en la síntesis de ácido micólico presente en la pared celular del *M. tuberculosis* y patogénesis y Rv2873, una lipoproteína presente en mayor cantidad en el *M. bovis* de que en el *M. tuberculosis*<sup>28-31</sup>.

## METABOLOMAS

La metabolómica es el estudio de la huella de metabolitos de una célula, órgano u organismo. Así como las otras “ómicas”, la metabolómica es una herramienta de amplia escala, pero tiene la ventaja de proveer el retrato de un organismo en un determinado instante. Su capacidad de detección está limitada a moléculas de tamaños reducidos, cuya masa atómica es menor que 3.000. Steve Oliver, de la Universidad de Manchester, describió la metabolómica como: “un grupo de metabolitos de bajo peso molecular, que son dependientes del contexto al cual estos metabolitos se encuentran inmersos y que varían de acuerdo con la fisiología y estado patológico o de desarrollo de la célula, tejido, órgano u organismo<sup>32</sup>.”

En el análisis metabolómico son estudiados una gran variedad de compuestos químicos, incluyendo: azúcares, aminoácidos, esteroides, ácidos grasos, fosfolípidos y ácidos orgánicos. Estos metabolitos pueden ser divididos con base en la solubilidad en soluciones acuosas. Los métodos de la metabolómica convencional enfatiza el estudio de extractos de moléculas solubles en agua, encontradas en el citoplasma celular. Compuestos hidrofóbicos como los ácidos grasos y



colesterol son normalmente encontrados en la superficie celular y son objetos del estudio de una subespecialidad de la metabolómica, la lipidómica<sup>33</sup>.

Un factor del *M. tuberculosis* que puede ser explorado para el desarrollo de nuevas herramientas de diagnósticos es la pared celular. Aproximadamente el 40% del peso seco de la pared celular del *M. tuberculosis* está compuesto por lípidos y un tercio de su genoma es utilizado en la biosíntesis y metabolismo de lípidos<sup>33-35</sup>. Un análisis de lipidómica reciente mostró que el *M. tuberculosis* contienen aproximadamente 5.000 especies lipídicas<sup>33</sup>.

El *M. tuberculosis* constantemente remodela el contenido de lípidos de la pared celular en respuesta a las condiciones estresantes impuestas por la respuesta inmune del hospedero<sup>35</sup>. Cambios en la composición lipídica de la pared celular resulta en una mayor concentración de lípidos menos inmunogénicos en la pared celular, lo que parece contribuir para que el *M. tuberculosis* establezca una infección de largo plazo<sup>35,36</sup>.

Otro mecanismo observado durante la infección y que también es dependiente de los lípidos del *M. tuberculosis* es la alteración de la homeostasis lipídica en las células del hospedero. Algunos lípidos del *M. tuberculosis* son capaces de estimular la acumulación de gotas de lípidos conteniendo colesterol, triacilglicerol y fosfolípidos, resultando en la formación de los macrófagos espumosos. Esta condición parece crear un ambiente propicio para la sobrevivencia del *M. tuberculosis* en el medio intracelular<sup>37</sup>.

La metabolómica y la lipidómica pueden detectar los subproductos del metabolismo bacteriano y las alteraciones metabólicas ocurridas en el hospedero. Estas informaciones pueden ser usadas en la identificación de biomarcadores para la TB. En un estudio piloto, Frediani et al (2014)<sup>38</sup> realizaron un análisis metabolómico en plasma de individuos diagnosticados con TB activa y en los comunicantes saludables.

En este estudio los autores identificaron diversos metabolitos que se mostraron cuantitativamente distintos entre estos dos grupos. La identificación putativa de estos metabolitos reveló, por ejemplo, el aumento del aminoácido glutamina, del glicolípido de la pared celular del *M. tuberculosis*, trealose-6-mycolato, y de una resolvina de la serie D, en los individuos infectados.

En otro estudio, el análisis metabolómico identificó 20 metabolitos que permitieron, consistentemente, distinguir individuos con TB activa y latente. Además de proveer biomarcadores metabolitos para TB, esta herramienta también mostró que la infección por el *M. tuberculosis* altera los metabolitos asociados a la anti-inflamación, inmunosupresión y estrés<sup>39</sup>.

Es posible que las alteraciones lipídicas ocurridas en el hospedero y consecuentes de la infección por el *M. tuberculosis*, puedan ser detectadas a partir del análisis lipidómico en el suero o plasma de los pacientes con TB. La detección del glicolípido del *M. tuberculosis* trealose-6-mycolato en pacientes con TB (Frediani et al., 2014)<sup>38</sup> crea la perspectiva de que: 1 - nuevas herramientas de diagnósticos

basadas en la detección de compuestos lipídicos del *M. tuberculosis* sean desarrolladas y 2 - otros lípidos de la pared celular del *M. tuberculosis* sean identificados en el suero de pacientes con TB y permitan una mejor comprensión de las alteraciones lipídicas del *M. tuberculosis* durante la infección. En conjunto, las modificaciones de la composición lipídica de la pared celular del *M. tuberculosis* y las alteraciones en la homeostasis lipídica en el hospedero durante la TB, pueden ser detectadas por los análisis lipidómicos.

Estas informaciones pueden ser útiles para la identificación de potenciales biomarcadores capaces de prever la progresión de la TB latente para la enfermedad activa<sup>38</sup>.

## CONSIDERACIONES FINALES

En una enfermedad tan compleja como la TB, el descubrimiento de nuevos biomarcadores puede contribuir para la mejor comprensión y potencial resolución de desafíos relacionados con la prevención, al diagnóstico (fundamental en niños), al tratamiento y al desenlace clínico. La conducción adecuada del agravamiento de la salud en la franja etaria pediátrica podrá resultar en una menor morbimortalidad de la población afectada por la enfermedad.

## AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Clemax Couto Sant'Anna (UFRJ), nuestra referencia de investigador en TB pediátrica, por toda su contribución en nuestra investigación en biomarcadores en tuberculosis de niños y adolescentes.

Al Prof. Lee Riley (Universidad de California, Berkeley), por el ejemplo del rigor académico y por todo el incentivo y apoyo para la investigación de biomarcadores en tuberculosis, realizada por el grupo de Estudios en Tuberculosis Pediátrica de la Universidad Federal Fluminense.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization - WHO. Global tuberculosis report 2016. [acesso 2017 Mar 24]. Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
2. Yerlikaya S, Broger T, MacLean E, Pai M, Denkinger CM. A tuberculosis biomarker database: the key to novel TB diagnostics. *Int J Infect Dis.* 2017;56:253-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.025>
3. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Hesselning AC, Obihara CC, Starke JJ, et al. The natural history of childhood intra-thoracic tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8(4):392-402.
4. Graham SM, Cuevas LE, Jean-Philippe P, Browning R, Casenghi M, Detjen AK, et al. Clinical Case Definitions for Classification of Intrathoracic Tuberculosis in Children: An Update. *Clin Infect Dis.* 2015;61 Suppl 3:S179-87. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ581>
5. Khosravi AD, Alami A, Meghdadi H, Hosseini AA. Identification of Mycobacterium tuberculosis in Clinical Specimens of Patients Suspected of Having Extrapulmonary Tuberculosis by Application of Nested PCR on Five Different Genes. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:3. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2017.00003>

6. Starke JR; Committee On Infectious Diseases. Interferon- $\gamma$  release assays for diagnosis of tuberculosis infection and disease in children. *Pediatrics*. 2014;134(6):e1763-73. PMID: 25422024 DOI: <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2014-2983>
7. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações Para o Controle da Tuberculose no Brasil [Internet]. 2011 [acesso 2017 Mar 24]. Disponível em: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_recomendacoes\\_controle\\_tuberculose\\_brasil.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil.pdf)
8. Hatherill M, Tait D, McShane H. Clinical Testing of Tuberculosis Vaccine Candidates. *Microbiol Spectr*. 2016;4(5). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dyw058>
9. Doherty TM, Wallis RS, Zumla A. Biomarkers of disease activity, cure, and relapse in tuberculosis. *Clin Chest Med*. 2009;30(4):783-96. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2009.08.008>
10. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89-95. DOI: <http://dx.doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
11. Jacobsen M, Mattow J, Repsilber D, Kaufmann SH. Novel strategies to identify biomarkers in tuberculosis. *Biol Chem*. 2008;389(5):487-95. PMID: 18953715 DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2008.053>
12. Loots DT. TB or not TB? Improving the understanding and diagnosis of tuberculosis through metabolomics. *Biomark Med*. 2016;10(10):1025-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.2217/bmm-2016-0206>
13. Wallis RS, Wang C, Doherty TM, Onyebujoh P, Vahedi M, Laang H, et al. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(2):68-9. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70003-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70003-7)
14. Clavijo E, Díaz R, Anguita A, García A, Pinedo A, Smits HL. Comparison of a dipstick assay for detection of Brucella-specific immunoglobulin M antibodies with other tests for serodiagnosis of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(4):612-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CDLI.10.4.612-615.2003>
15. Achkar JM, Ziegenbalg A. Antibody responses to mycobacterial antigens in children with tuberculosis: challenges and potential diagnostic value. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(12):1898-906. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CI.00501-12>
16. Pan-Hammarström Q, Zhao Y, Hammarström L. Class switch recombination: a comparison between mouse and human. *Adv Immunol*. 2007;93:1-61. PMID: 17383538
17. Siegrist CA. The challenges of vaccine responses in early life: selected examples. *J Comp Pathol*. 2007;137 Suppl 1:S4-9. PMID: 17559867 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.04.004>
18. Schroeder HW Jr, Mortari F, Shiohawa S, Kirkham PM, Elgavish RA, Bertrand FE 3rd. Developmental regulation of the human antibody repertoire. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;764:242-60. PMID: 7486531
19. Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, et al. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med*. 2007;4(6):e202. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0040202>
20. Steingart KR, Dendukuri N, Henry M, Schiller I, Nahid P, Hopewell PC, et al. Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(2):260-76. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CI.00355-08>
21. Sant'anna CC, Schmidt CM, March Mde F, Pereira SM, Barreto ML. Tuberculosis among adolescents in two Brazilian State capitals. *Cad Saude Publica*. 2013;29(1):111-6.
22. Beyazova U, Rota S, Cevheroğlu C, Karşlıgil T. Humoral immune response in infants after BCG vaccination. *Tuber Lung Dis*. 1995;76(3):248-53. PMID: 7548909 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0962-8479\(05\)80013-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0962-8479(05)80013-9)
23. World Health Organization - WHO. PowerPoint Presentation - Tuberculosis Serodiagnostic Tests Policy Statement 2011. [Internet] [acesso 2017 Mar 24]. Disponível em: [http://www.who.int/tb/features\\_archive/factsheet\\_serodiagnostic\\_test.pdf](http://www.who.int/tb/features_archive/factsheet_serodiagnostic_test.pdf)
24. Wei M, Wu ZY, Lin JH, Li Y, Qian ZX, Xie YQ, et al. Regulation network of serum cytokines induced by tuberculosis-specific antigens reveals biomarkers for tuberculosis diagnosis. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):17182-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.December.16.18>
25. Jenum S, Dhanasekaran S, Ritz C, Macaden R, Doherty TM, Grewal HM; TB Trials Study Group, et al. Added Value of IP-10 as a Read-Out of Mycobacterium tuberculosis: Specific Immunity in Young Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(12):1336-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0000000000001328>
26. National Human Genome Research Institute (NHGRI). Transcriptome Fact Sheet [acesso 2017 Mar 30]. Disponível em: <https://www.genome.gov/13014330/transcriptome-fact-sheet/>
27. Anderson ST, Kaforou M, Brent AJ, Wright VJ, Banwell CM, Chagaluka G, et al. Diagnosis of childhood tuberculosis and host RNA expression in Africa. *N Engl J Med*. 2014;370(18):1712-23. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1303657>
28. Flores-Villalva S, Rogríguez-Hernández E, Rubio-Venegas Y, Cantó-Alarcón JG, Milián-Suazo F. What Can Proteomics Tell Us about Tuberculosis? *J Microbiol Biotechnol*. 2015;25(8):1181-94.
29. Raynaud C, Papavinasundaram KG, Speight RA, Springer B, Sander P, Böttger EC, et al. The functions of OmpATb, a pore-forming protein of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol*. 2002;46(1):191-201. PMID: 12366842 DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03152.x>
30. Bhatt A, Fujiwara N, Bhatt K, Gurcha SS, Kremer L, Chen B, et al. Deletion of kasB in Mycobacterium tuberculosis causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(12):5157-62. PMID: 17360388 DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0608654104>
31. Wiker HG. MPB70 and MPB83-major antigens of Mycobacterium bovis. *Scand J Immunol*. 2009;69(6):492-9. PMID: 19439009 DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02256.x>
32. Oliver SG. Functional genomics: lessons from yeast. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2002;357(1417):17-23. PMID: 11839178 DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2001.1049>
33. Layre E, Sweet L, Hong S, Madigan CA, Desjardins D, Young DC, et al. A comparative lipidomics platform for chemotaxonomic analysis of Mycobacterium tuberculosis. *Chem Biol*. 2011;18(12):1537-49. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.10.013>
34. Anderson RJ. The Chemistry of the Lipids of the Tubercle Bacillus. *Yale J Biol Med*. 1943;15(3):311-45. PMID: 21434068
35. Queiroz A, Riley LW. Bacterial immunostat: Mycobacterium tuberculosis lipids and their role in the host immune response. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(1):9-18. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2016>
36. Queiroz A, Medina-Cleghorn D, Marjanovic O, Nomura DK, Riley LW. Comparative metabolic profiling of mce1 operon mutant vs wild-type Mycobacterium tuberculosis strains. *Pathog Dis*. 2015;73(8):ftv066. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftv066>
37. Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, Bardou F, et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence. *PLoS Pathog*. 2008;4(11):e1000204. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000204>
38. Frediani JK, Jones DP, Tukvadze N, Uppal K, Sanikidze E, Kipiani M, et al. Plasma metabolomics in human pulmonary tuberculosis disease: a pilot study. *PLoS One*. 2014;9(10):e108854. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0108854>
39. Weiner J 3rd, Parida SK, Maertzdorf J, Black GF, Repsilber D, Telaar A, et al. Biomarkers of inflammation, immunosuppression and stress with active disease are revealed by metabolomic profiling of tuberculosis patients. *PLoS One*. 2012;7(7):e40221. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040221>