



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

ARTIGO ORIGINAL

Utilização de biomarcadores na tuberculose pediátrica

Use of biomarkers in pediatric tuberculosis

Christiane Mello Schmidt¹, Adriano Queiroz², Claudete Aparecida Araújo Cardoso³

Palavras-chave:

biomarcadores
farmacológicos,
tuberculose,
criança.

Resumo

No presente artigo são revisados o conceito de biomarcadores e *biosignature* e o seu potencial uso na tuberculose pediátrica, com aplicação no desenvolvimento de novas vacinas e de novos métodos laboratoriais que permitam o diagnóstico mais preciso e a avaliação da resposta ao tratamento. Enfatizam-se, também, os métodos que incluem a dosagem de anticorpos, citocinas, transcriptomas, proteomas e 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.

¹ Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente - Professora Assistente em Pediatria do Departamento Materno Infantil da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil.

² Pós-Doutorado em Saúde Pública - Pesquisador do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ - CPQGM/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³ Pós-doutorado em Saúde Pública - Professora Adjunta em Pediatria do Departamento Materno Infantil da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil.

Endereço para correspondência:

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

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), cujo agente etiológico identificado em 1882 é o *Mycobacterium tuberculosis*, ainda representa um desafio para a saúde pública no mundo^{1,2}. As dificuldades para o melhor controle dessa doença estão relacionadas à pobreza, ao retardo no diagnóstico de casos com TB ativa, à falta de adesão ao tratamento, à infecção por cepas resistentes, à coinfeção pelo HIV, ao controle inadequado dos contactantes e o não tratamento dos casos de infecção latente pela TB (ILT^B)¹.

Do ponto de vista pediátrico, o diagnóstico da TB pulmonar se constitui um desafio na prática clínica, uma vez que as crianças podem apresentar-se com sinais, sintomas clínicos e alterações radiológicas inespecíficas. Nesta faixa etária, as lesões secundárias a TB comumente são paucibacilares, tornando o isolamento da bactéria difícil. Soma-se a esse isolamento difícil o fato de as crianças não conseguirem expectorar. Ademais, o risco de adoecimento é maior nos dois primeiros anos de infecção e as crianças menores de 5 anos são mais susceptíveis a desenvolver formas graves da doença³.

A TB nas crianças pode ser classificada como TB confirmada, TB não confirmada e TB improvável. A TB confirmada é aquela em que o resultado da cultura para o *M. tuberculosis* e/ou do teste rápido molecular para pesquisa do DNA bacteriano foram positivos. Na TB não confirmada, não houve confirmação bacteriológica e os indivíduos tiveram ao menos dois dos seguintes achados: sintomas ou a radiografia de tórax com achados sugestivos de TB, história de contato para TB, evidência ou não de infecção pelo *M. tuberculosis* e adequada resposta ao tratamento específico. Entende-se por evidência de infecção para a TB, o resultado positivo da prova tuberculínica e/ou a dosagem de interferon gama (Igras). Nos casos de TB improvável, os pacientes não tiveram confirmação bacteriológica nem preencheram os critérios para TB não confirmada⁴.

Esta classificação, recentemente proposta por Graham et al.⁴, inclusive para uniformização da classificação dos casos em estudos com TB pediátrica, demonstra a dificuldade que ainda temos na definição desses casos e como novos métodos diagnósticos podem contribuir para confirmar os casos de TB com bacteriologia negativa, evitando assim o tratamento desnecessário desses pacientes. Da mesma forma, o controle laboratorial da resposta ao tratamento nos pacientes com TB não confirmada ou improvável apresenta limitações. Os casos de TB extrapulmonar também costumam ser paucibacilares⁵. Estas situações em que não há confirmação bacteriológica constituem ainda um desafio na prática clínica pediátrica.

Até o momento, distinguir entre ILTB e TB ativa pode ser difícil e os métodos laboratoriais disponíveis como o teste tuberculínico e a dosagem de interferon gama não permitem esta diferenciação⁶. Discriminar essas duas situações é fundamental. Primeiro, o diagnóstico de ILTB, em que o

paciente está infectado e não apresenta sinais e sintomas de TB pulmonar ou extrapulmonar, permite o uso de apenas um fármaco, a isoniazida, por seis meses, conforme indicado atualmente pelo Ministério da Saúde⁷.

Tal medida diminui o risco de adoecimento do paciente. Além disso, a dificuldade em discriminar as duas situações pode levar ao tratamento equivocado de um caso de ILTB com três ou quatro medicamentos, dependendo da idade do paciente e também o uso de monoterapia, com isoniazida para casos de TB ativa. Ambos os tratamentos, quando realizados de maneira equivocada, contribuem para a elevação da morbidade da população afetada.

Ainda hoje, a vacina BCG, disponível para uso em dose única nas crianças ao nascimento, protege apenas contra as formas disseminadas da doença (TB miliar e meningoencefalite tuberculosa), com uma proteção que não ultrapassa 80%⁸.

Nesse contexto, o melhor conhecimento das características biológicas do agente etiológico, bem como a sua interação com o hospedeiro por meio da mensuração de biomarcadores, podem promover o desenvolvimento de novos métodos laboratoriais que possam contribuir na resposta a esses desafios e, conseqüentemente, no melhor controle da doença.

BIOMARCADORES E BIOASSINATURA: DEFINIÇÃO

Os biomarcadores são definidos como moléculas que têm a característica de medir e expressar um processo biológico normal, um processo patogênico e também a resposta terapêutica à intervenção farmacológica^{9,10}. O biomarcador pode ser originário do patógeno ou do hospedeiro, podendo ser detectado através de uma única medida em uma amostra ou através de um estímulo, *in vivo* ou *in vitro*. Quando característico de uma doença, o biomarcador ou a *biosignatura* tem a possibilidade de ser utilizado como teste diagnóstico⁹.

A bioassinatura é definida como um “set” ou conjunto de biomarcadores.

Em uma doença tão complexa como a TB, que ainda apresenta tantos desafios, a dosagem de vários ao invés de um biomarcador parece ser mais eficaz na tentativa de elucidá-los¹¹.

BIOMARCADORES NA TUBERCULOSE: POTENCIAIS DE APLICABILIDADE NA PRÁTICA CLÍNICA PEDIÁTRICA

A descoberta de novos biomarcadores abre uma perspectiva para a sua utilização em diferentes situações clínicas de desafio enfrentadas para o melhor controle da TB.

Algumas características são importantes para um bom biomarcador: diferenciar indivíduos saudáveis e com TB ativa, normalizar com o tratamento e ser reprodutível em diferentes

populações com relação ao desfecho clínico¹⁰. Outro aspecto interessante relativo aos biomarcadores é a possibilidade de ser mensurado em outros espécimes clínicos tais como sangue, urina e ar exalado, dentre outros¹².

O desenvolvimento de pequenos dispositivos portáteis - um teste *point of care* - para a dosagem de biomarcadores, em amostras que não o escarro - é uma necessidade para o atendimento inicial dos pacientes com suspeita de TB. Como nas crianças e nos pacientes com coinfeção TB/HIV a qualidade do escarro coletado é prejudicada e a sensibilidade da baciloscopia é baixa, um teste rápido com potencial de ser realizado em outras amostras e que apresente moderada a elevada sensibilidade e alta especificidade pode ser de grande utilidade².

Ainda sob o ponto de vista de diagnóstico, seria interessante um marcador que indicasse aqueles indivíduos com maior risco de adoecimento ou de evolução de ILTB para TB ativa¹³.

Com relação ao tratamento, os biomarcadores podem ser úteis na detecção de casos com possibilidade de receber esquemas terapêuticos de menor duração, prever o risco de recaída e também avaliar a resposta ao tratamento⁹.

Para o desenvolvimento de novas vacinas, os biomarcadores têm o potencial de identificar moléculas mais imunogênicas, quantificar a reatividade de células T aos antígenos vacinais e determinar a durabilidade desta resposta em relação à dose da vacina e quanto ao uso ou não de adjuvante¹³.

A INTERAÇÃO DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COM O HOSPEDEIRO

A infecção pelo *M. tuberculosis* desencadeia resposta imune humoral, com a síntese de anticorpos de vários isotipos (IgA, IgM e IgG) contra os antígenos das micobactérias e também a resposta imune celular, com ativação de monócitos, macrófagos e linfócitos¹¹. Assim, tanto a dosagem de anticorpos específicos como de produtos liberados por células ativadas - enzimas, citocinas, transcriptomas, proteomas e metabolomas - têm o potencial de serem biomarcadores úteis no melhor conhecimento do agente etiológico e de sua interação com o hospedeiro.

Sabe-se que existe uma complexa interação entre a epidemiologia, o agente infeccioso e o hospedeiro com relação ao desenvolvimento da doença. Tal complexidade de interação se justifica pelo fato de que a resposta a um agravo infeccioso depende de múltiplos fatores. O grande desafio se constitui em definir um biomarcador que reflita essa interação e se constitua uma ferramenta que poderá potencialmente desempenhar um papel relevante ao diferenciar as crianças saudáveis daquelas com TB ativa, além de retornar aos níveis normais com a instituição da terapêutica e ser replicável em outras populações.

DOSAGEM DE ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

A dosagem sérica de anticorpos específicos nos casos de TB pediátrica é instigante, visto que esta análise não precisa de coleta de material do sítio de infecção e pode ser mensurada de forma rápida e com relativo baixo custo, utilizando dispositivos simples^{14,15}.

Na infância, ao avaliarmos os testes diagnósticos envolvendo a dosagem de imunoglobulinas, é necessário considerar alguns aspectos do sistema imune neste grupo etário. Nos lactentes e nas crianças menores, o sistema imune ainda está em desenvolvimento. Os recém-nascidos inicialmente respondem aos antígenos com maior síntese de IgM. A proteção pela IgG se dá principalmente pela passagem deste isotipo a partir da placenta e a IgA é fornecida principalmente pelo leite materno^{16,17}. Os níveis das imunoglobulinas IgM, IgG e IgA atingem valores próximos aos adultos aos 2, 6 e 10 anos, respectivamente¹⁸. Vários estudos referentes ao uso da sorologia como método diagnóstico na TB foram realizados em adultos. Achkar & Ziegenbalg¹⁵ realizaram uma revisão sobre o tema em Pediatria e encontraram 23 artigos. Nesta revisão, foram encontradas grandes variações entre os níveis de anticorpos; a sensibilidade variou de 14 a 85% e a especificidade de 86 a 100%.

Os autores destacam dificuldades em comparar os resultados entre esses estudos devido a diferenças na metodologia entre eles, tais como: idade dos pacientes, antígenos distintos (Ag5, "old tuberculina", A60 (ANDA-TB) 16KDA, 30 KDA, 38 KDA, PPD, ESAT-6, TBLG, LOS, DAT, PGBTb1, complexo Ag 85 e CFP 10), isotipo avaliado (IgM, IgG, IgA e IgE), isolados ou combinados, uso de kits comerciais ou métodos *in house* e tipo de TB apresentada pelos pacientes nas pesquisas (confirmada, não confirmada e improvável)^{4,15}.

Quanto ao tipo de TB, estudos avaliando a sorologia demonstram que nos pacientes com lesões cavitárias, e conseqüentemente maior carga bacilar, o nível de anticorpos é maior provavelmente devido a maior estímulo antigênico e maior resposta inflamatória^{19,20}. Ressalta-se que as lesões cavitárias são achados menos frequentes nos casos de TB pulmonar em crianças quando comparadas com adolescentes e adultos²¹.

Outro aspecto a ser considerado em relação ao uso deste método em TB pediátrica é a relação dos níveis de anticorpos anti-antígenos das micobactérias e a vacinação prévia com BCG. Estes anticorpos são influenciados pela idade da criança, tempo de vacinação com BCG, antígeno e isotipo testado¹⁵. Alguns estudos encontraram níveis mais elevados para determinado antígeno quando comparadas crianças vacinadas e não vacinadas²². No entanto, de uma forma geral, diversos autores mostraram que a história prévia de vacinação BCG não influencia os níveis de anticorpos para diferentes antígenos testados¹⁵.

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) não recomenda a utilização de testes sorológicos para o diagnóstico de TB nas diversas faixas etárias²³.

CITOCINAS

As citocinas, secretadas pelas células ativadas por antígenos do *M. tuberculosis*, têm potencial para serem utilizadas como biomarcadores em TB, especialmente na distinção entre ILTB, TB ativa e outras doenças pulmonares. Para serem potenciais biomarcadores, as moléculas avaliadas devem apresentar algumas características como: estarem “upregulated” nos casos de TB ativa quando comparadas com indivíduos com ILTB e saudáveis, e serem secretadas pelas células estimuladas especificamente por antígenos específicos do *M. tuberculosis*. Algumas citocinas podem ser liberadas por macrófagos e células T inespecíficas e apresentarem-se elevadas em várias doenças. Estas citocinas já foram detectadas em níveis elevados em pacientes com TB: I-309, CXCL9, IL-10, IL-6, IL-7, IL-8, G-CSF, TGF- β 1, CCL2, IL2, IL13 e TNF-F α ²⁴.

A dosagem de IP-10 (*interferon gamma inducible protein 10*) tem sido avaliada em pesquisas relacionadas à TB pediátrica. Jenum et al.²⁵ encontraram resultados promissores avaliando crianças na Índia, quando associaram a análise desta citocina ao interferon gama.

A comparação entre os resultados dos estudos avaliando citocinas em TB pode ser difícil, pois há diferença entre as citocinas e os métodos utilizados para identificá-las²⁴.

A dosagem da citocina interferon-gama (Igras) está disponível comercialmente para uso na prática clínica. Tem a vantagem de não sofrer a interferência da vacinação BCG nem ao contato prévio com outras micobactérias. No entanto, esse método laboratorial não permite a diferenciação entre ILTB e TB ativa. Em crianças menores de 2 anos este método apresenta limitações⁶. No Brasil, não está disponível para uso nas unidades públicas de saúde.

TRANSCRIPTOMAS

A leitura de parte do DNA resulta em moléculas de RNA -os transcriptos. A coleção de transcriptos é denominada transcriptoma. A avaliação dos transcriptomas permite analisar em uma célula quais gens estão ou não ativados nas diversas circunstâncias. A maioria dos transcriptos é formada de RNA mensageiro que está diretamente relacionado à síntese de proteínas²⁶.

Um estudo prospectivo, realizado em crianças com suspeita de TB, infectadas ou não pelo HIV, na África do Sul, Malawi e Quênia, identificou uma assinatura de 51 transcriptos, que possibilitou a diferenciação entre TB e outras doenças. A sensibilidade foi de 82,9% e a especificidade de 83,6%, para o diagnóstico nos pacientes com TB confirmada por cultura. A sensibilidade foi de 62,5 a 82,3%, 42,1% a 80,8% e 35,3 a 79,6%, respectivamente, nas crianças com TB

altamente provável, provável ou possível respectivamente, mas com a cultura negativa²⁷.

PROTEOMAS

O conjunto de proteínas expresso por determinada célula, nas diversas situações, denomina-se proteoma. Inicialmente, proteínas do *M. tuberculosis* foram identificadas por meio de métodos imunológicos e bioquímicos. A partir dos anos 90, novas tecnologias como a eletroforese 2-D e a espectrometria de massa vêm permitindo a identificação de diversas proteínas desse microorganismo²⁸.

A análise de diferentes componentes celulares pode identificar marcadores imunogênicos, de virulência, de estado de latência ou atividade, que podem ter utilidade no desenvolvimento de novas vacinas, drogas e ferramentas para um diagnóstico mais preciso da TB²⁸.

Alguns exemplos de proteínas, entre outras, já isoladas: Rv0899, que permite a sobrevivência da bactéria em pH baixo, Rv2246, envolvida na síntese de ácido micólico presente na parede celular do *M. tuberculosis* e patogênese e Rv2873, uma lipoproteína presente em maior quantidade no *M. bovis* do que no *M. tuberculosis*²⁸⁻³¹.

METABOLOMAS

A metabolômica é o estudo do repertório de metabólitos de uma célula, órgão ou organismo. Assim como as outras “ômicas”, a metabolômica é uma ferramenta de larga escala, mas tem a vantagem de prover o retrato de um organismo em um determinado instante. Sua capacidade de detecção está limitada a moléculas de tamanhos reduzidos, cuja massa atômica é menor que 3.000. Steve Oliver, da Universidade de Manchester, descreveu a metabolômica como: “um grupo de metabólitos de baixo peso molecular, que são dependentes do contexto ao qual estes metabólitos estão inseridos e que variam de acordo com a fisiologia e estado patológico ou de desenvolvimento da célula, tecido, órgão ou organismo³².”

Na análise metabolômica são estudados uma grande variedade de compostos químicos, incluindo: açúcares, aminoácidos, esteroides, ácidos graxos, fosfolípidios e ácidos orgânicos. Esses metabólitos podem ser divididos com base na solubilidade em soluções aquosas. Os métodos de metabolômica convencional têm enfatizado no estudo de extratos de moléculas solúveis em água, encontradas no citoplasma celular. Compostos hidrofóbicos como os ácidos graxos e colesterol são normalmente encontrados na superfície celular e são objetos de estudo de uma subespecialidade da metabolômica, a lipidômica³³.

Um fator do *M. tuberculosis* que pode ser explorado para o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas é a parede celular. Cerca de 40% do peso seco da parede celular do *M. tuberculosis* é composto de lípidios e um terço do seu genoma é devotado à biossíntese e metabolismo de lípidios³³⁻³⁵. Uma análise de lipidômica recente mostrou que o *M. tuberculosis* contém cerca de 5.000 espécies lipídicas³³.

O *M. tuberculosis* constantemente remodela o conteúdo de lipídios da parede celular em resposta às condições estressantes impostas pela resposta imune do hospedeiro³⁵. Mudanças na composição lipídica da parede celular resultam em uma maior concentração de lipídios menos imunogênicos na parede celular, o que parece contribuir para que o *M. tuberculosis* estabeleça uma infecção de longo prazo^{35,36}.

Outro mecanismo observado durante a infecção e que também é dependente dos lipídios do *M. tuberculosis* é a alteração da homeostase lipídica nas células do hospedeiro. Alguns lipídios do *M. tuberculosis* são capazes de estimular o acúmulo de gotas de lipídios contendo colesterol, triacilglicerol e fosfolipídios, resultando na formação dos macrófagos espumosos. Essa condição parece criar um ambiente propício à sobrevivência do *M. tuberculosis* no meio intracelular³⁷.

A metabolômica e a lipidômica podem detectar os subprodutos do metabolismo bacteriano e as alterações metabólicas ocorridas no hospedeiro. Essas informações podem ser usadas na identificação de biomarcadores para a TB. Em um estudo piloto, Frediani et al.³⁸ realizaram uma análise de metabolômica em plasma de indivíduos diagnosticados com TB ativa e nos comunicantes saudáveis.

Nesse estudo os autores identificaram diversos metabólitos que se mostraram quantitativamente distintos entre esses dois grupos. A identificação putativa desses metabólitos revelou, por exemplo, o aumento do aminoácido glutamina, do glicolipídio de parede celular do *M. tuberculosis*, trealose-6-micolato, e de uma resolvina da série D, nos indivíduos infectados³⁸.

Em um outro estudo, a análise de metabolômica identificou 20 metabólitos que permitiram, consistentemente, distinguir indivíduos com TB ativa e latente. Além de prover biomarcadores metabólitos para TB, essa ferramenta também mostrou que a infecção pelo *M. tuberculosis* altera metabólitos associados à anti-inflamação, imunossupressão e estresse³⁹.

É possível que as alterações lipídicas ocorridas no hospedeiro e decorrentes da infecção pelo *M. tuberculosis* possam ser detectadas a partir da análise de lipidômica no soro ou plasma dos pacientes com TB. A detecção do glicolipídio do *M. tuberculosis* trealose-6-micolato em pacientes com TB (Frediani et al.³⁸) cria a perspectiva de que: 1 - novas ferramentas diagnósticas baseadas na detecção de compostos lipídicos do *M. tuberculosis* sejam desenvolvidas e 2 - outros lipídios da parede celular do *M. tuberculosis* sejam identificados no soro de pacientes com TB e permitam uma melhor compreensão das alterações lipídicas do *M. tuberculosis* durante a infecção.

Em conjunto, as modificações da composição lipídica da parede celular do *M. tuberculosis* e as alterações na homeostase lipídica no hospedeiro durante a TB podem ser detectadas pelas análises de lipidômica. Essas informações podem ser úteis para a identificação de potenciais biomarcadores capazes de prever a progressão da TB latente para a doença ativa³⁸.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em uma doença tão complexa como a TB, a descoberta de novos biomarcadores pode contribuir para melhor compreensão e potencial resolução de desafios relacionados à prevenção, ao diagnóstico (fundamental em crianças) ao tratamento e ao desfecho clínico. O manuseio adequado de tal agravo de saúde na faixa etária pediátrica poderá resultar em menor morbimortalidade da população acometida pela doença.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Clemax Couto Sant'Anna (UFRJ), nossa referência de pesquisador em TB pediátrica, por toda a sua contribuição em nossa pesquisa em biomarcadores na tuberculose em crianças e adolescentes.

Ao Prof. Lee Riley (Universidade da Califórnia, Berkeley), pelo exemplo de rigor acadêmico e por todo o incentivo e apoio à pesquisa de biomarcadores em tuberculose realizada pelo grupo de Estudos em Tuberculose Pediátrica na Universidade 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/
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- γ 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
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/CVI.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, Shiokawa 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/CVI.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
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>