



Linfócitos e citocinas séricas: valor diagnóstico e influência no estado imunológico de pacientes com tuberculose pulmonar

Zhiqiang Ma¹, Shenghao Li¹, Yuan Liu¹, Caixin Li¹, Xiaoyan Wang¹,
Xingrui Tang¹, Rui Dong¹, Shitai Zheng¹, Lin Wang¹

1. The Third People's Hospital of Kunming, Kunming, China.

Recebido: 11 maio 2023.

Aprovado: 15 julho 2023.

Trabalho realizado no Third People's Hospital of Kunming, Kunming, China.

RESUMO

Objetivo: Determinar o número absoluto de linfócitos T séricos e os níveis de citocinas séricas, bem como as características, de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e avaliar o efeito desses no estado imunológico desses pacientes e seu valor diagnóstico e preditivo para tuberculose. **Métodos:** Foram incluídos 1.069 pacientes com tuberculose ativa, 51 pacientes com tuberculose latente e 600 indivíduos saudáveis. Foram realizadas a contagem absoluta de linfócitos T séricos e a quantificação de citocinas séricas.

Resultados: Os linfócitos T estavam significativamente reduzidos nos pacientes com tuberculose ativa em comparação com os indivíduos saudáveis. A função imunológica dos pacientes diminuiu gradativamente com a idade e mostrou-se mais forte nas mulheres do que nos homens. As células Th1 expressaram maiores níveis de citocinas do que as células Th2. A análise de regressão logística mostrou que contagens reduzidas de células T CD3⁺, T CD8⁺ e NK e expressão reduzida de IL-4 e IFN- γ foram fatores de influência independentes para tuberculose ativa. A análise ROC mostrou que a sensibilidade e especificidade dos valores absolutos de linfócitos T CD3⁺ e T CD8⁺ e de fatores combinados foram significativamente maiores do que as da IL-4 e do IFN- γ para o diagnóstico da tuberculose ativa. **Conclusões:** A contagem de linfócitos T séricos e os níveis de citocinas séricas podem avaliar o estado imunológico de pacientes com tuberculose; também são biomarcadores úteis na predição e diagnóstico da tuberculose.

Descritores: Linfócitos; Citocinas; Tuberculose; Imunidade.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença inflamatória causada pela infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), sendo a tuberculose pulmonar a forma mais comum de apresentação clínica.⁽¹⁾ O Relatório Global de Tuberculose da OMS de 2022⁽²⁾ relatou 10,6 milhões de novos casos de tuberculose em todo o mundo em 2021, com uma taxa de incidência de 134 por 100.000 habitantes. Embora medicamentos antituberculose estejam disponíveis e o número de óbitos relacionados tenha diminuído globalmente nos últimos anos, a tuberculose ainda é a principal causa de morte por uma única doença infecciosa.⁽³⁾

Linfócitos T CD4⁺ eficazes podem ser divididos em pelo menos três subpopulações distintas: células Th1, Th2 e Th17. Essas subpopulações são funcionalmente controladas pelas células T CD4⁺ reguladoras e possuem um alto grau de especialização, sendo que o IFN- γ produzido pelas células Th1 desempenha um papel essencial na resistência do hospedeiro à infecção primária por Mtb. Além disso, o IFN- γ aumenta a atividade antibacteriana dos macrófagos e promove a produção de intermediários reativos de nitrogênio, que podem eliminar bactérias intracelularmente.^(4,5) Tanto modelos animais quanto

testes em humanos mostraram que os níveis de expressão de IFN- γ não fornecem proteção relevante e confiável contra a infecção por Mtb.⁽³⁾

A análise do número de linfócitos T e dos níveis de citocinas, tais como IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- α e IFN- γ , pode fornecer uma preciosa base de pesquisa para doenças por meio de métodos não invasivos para o estudo do estado do sistema imunológico dos pacientes.^(6,7) Neste estudo, analisamos o número absoluto de linfócitos T e os níveis de citocinas no soro de pacientes com tuberculose ativa (TBA), pacientes com tuberculose latente (TBL) e indivíduos saudáveis (IS) para fornecer uma referência para o diagnóstico da tuberculose e a avaliação do estado imunológico dos participantes.

MÉTODOS

Neste estudo, foram incluídos 1.069 pacientes com TBA, 600 IS e 51 pacientes com TBL. De acordo com o relatório da OMS,⁽²⁾ o diagnóstico da TBA é baseado em avaliação clínica, microbiologia, testes moleculares (tais como o GeneXpert Ultra) e achados de imagem. A TBL é definida como um resultado positivo no ensaio de liberação de IFN- γ sem outras manifestações clínicas

Endereço para correspondência:

Lin Wang. The Third People's Hospital of Kunming, 1 Ankang Road, Taiping New Town, An Ning City, Kunming, Yunnan Province, China.

Apoio Financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação Nacional de Ciências Naturais da China (protocolo n. 82260408), do Projeto de Pesquisa em Saúde da Comissão de Atenção à Saúde de Kunming (protocolos n. 2022-11-01-011 e n. 2022-11-01-004) e do Projeto de Qualificação de Talentos em Ciência e Tecnologia da Saúde de Kunming denominado "Milhares" [protocolos n. 2020-SW(Reserve)-60, n. 2022-SW(Reserve)-70 e n. 2022-SW(Reserve)-85].

ou com resultados microbiológicos, moleculares e de imagem negativos (Tabela 1).

Os critérios de exclusão foram os seguintes: doenças autoimunes ou distúrbios imunológicos concomitantes; AIDS; terapia com glicocorticoides; doenças concomitantes cardíacas, hepáticas, renais ou de outros órgãos importantes; hipertensão grave; má condição mental; diabetes mellitus concomitante; gravidez ou lactação; e tuberculose resistente. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do *Third People's Hospital* de Kunming (protocolo n. KSL20230320007).

Amostras de sangue periférico dos IS, dos pacientes com TBA e daqueles com TBL foram coletadas em tubos de coleta de sangue de 3 mL. Para os ensaios de citocinas, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1.000 × g por 10 min, e o soro foi testado com kits de ensaio de citocinas (Risskell Bio, Qingdao, China) para determinar os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17, TNF- α , IFN- α e IFN- γ) de acordo com as instruções do fabricante. Utilizou-se o programa MR Flow Analysis (AZE Ltd., Tóquio, Japão) para a análise dos resultados. Para os ensaios de citometria de fluxo, as amostras de sangue foram misturadas, e utilizou-se um kit de citometria de fluxo (DIALAB GmbH, Wiener Neudorf, Áustria) para determinar a contagem de linfócitos T CD3+, T CD4+, T CD8+, CD4+/CD8+, CD19+B, NK e NKT de acordo com as instruções do fabricante. Utilizou-se o programa LEGENDplex (BioLegend, San Diego, CA, EUA) para a análise dos resultados. Tanto os ensaios de citocinas quanto os de citometria de fluxo foram realizados utilizando citômetro de fluxo BriCyte E6 (Mindray, Shenzhen, China).

As análises estatísticas foram realizadas e plotadas por meio dos programas IBM SPSS Statistics, versão 24.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA) e GraphPad Prism, versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), respectivamente. Os dados quantitativos foram descritos em forma de média \pm dp quando obedeceram a uma distribuição normal utilizando um teste t, enquanto aqueles com distribuição não normal foram descritos em forma de mediana [IIQ] utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. As comparações entre grupos múltiplos foram feitas por meio do teste de Kruskal-Wallis, e as diferenças entre modelos multivariados foram determinadas por meio do teste t aninhado. A análise dos fatores de influência relevantes foi realizada por regressão logística. O valor diagnóstico dessas variáveis foi analisado por meio

de curvas ROC. O nível de significância estatística adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

O número de células T CD3+, T CD4+, T CD8+ e NK foi menor nos pacientes com TBA do que nos IS, sendo que essa diferença alcançou significância estatística. Além disso, o número absoluto de células T CD3+ no grupo TBL foi menor e significativamente diferente em comparação com o grupo IS, enquanto o número absoluto de células T CD4+, T CD8+ e NK foi maior, mas sem significância estatística. No grupo TBA, os níveis de IL-1 β , IL-2, IL-8 e IL-17 foram maiores e os de IL-4, IL-6, TNF- α e IFN- γ foram menores em comparação com o grupo IS. No que tange ao grupo TBL, os níveis de IL-1 β , IL-5 e IFN- γ foram menores e os de IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17 e TNF- α foram maiores em comparação com o grupo IS. Todas essas diferenças alcançaram significância estatística, o que sugeriu que fatores inflamatórios se expressam diferencialmente na TBA e na TBL (Figura 1).

Analisamos a expressão dos indicadores associados a diferenças estatisticamente significativas entre os grupos TBA e IS por sexo e idade. No grupo TBA, o número de células T CD3+, T CD4+ e T CD8+ foi menor nos homens do que nas mulheres; a diferença foi estatisticamente significativa, indicando que pacientes do sexo feminino com TBA são mais imunocompetentes do que pacientes do sexo masculino (Figura 2A). A expressão do número de células T CD3+, T CD4+ e T CD8+ diminuiu gradativamente com a idade, sendo que essa diferença atingiu significância estatística. Isso sugere que pacientes mais velhos com TBA têm pior função imunológica do que pacientes adolescentes. A expressão da citocina IFN- γ foi significativamente menor nos homens do que nas mulheres, enquanto os demais níveis de expressão não diferiram significativamente entre idade e sexo (Figura 2B).

Para determinar o efeito da TBA na frequência de células Th1/Th2, analisamos os níveis de expressão de IL-1 β , IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 nesse grupo. Como se pode observar na Figura 3, os pacientes com TBA exibiram expressão significativa de Th1 (IFN- γ e IL-1 β), enquanto apenas os níveis de IL-6 estavam aumentados (células Th2). Por outro lado, as células Th1 expressaram maiores níveis de citocinas do que as células Th2, e a diferença foi estatisticamente significativa, sugerindo que os níveis de citocinas expressos por células Th1 na TBA podem ser específicos para Mtb.

Tabela 1. Características dos participantes do estudo.^a

Característica	TBA	TBL	IS
Número de participantes	1.069	51	600
Sexo masculino	587 (54,9)	27 (52,9)	331 (55,2)
Idade, anos	45,4 \pm 17,4	36,3 \pm 17,6	41,7 \pm 17,2
IGRA positivo	1.069 (100)	51 (100)	0 (0)
Exame de imagem positivo	1.032 (96,5)	0 (0)	0 (0)

TBA: tuberculose ativa; TBL: tuberculose latente; IS: indivíduos saudáveis; e IGRA: *interferon gamma release assay* (ensaio de liberação de IFN- γ). ^aValores expressos em n, n (%) ou média \pm dp.

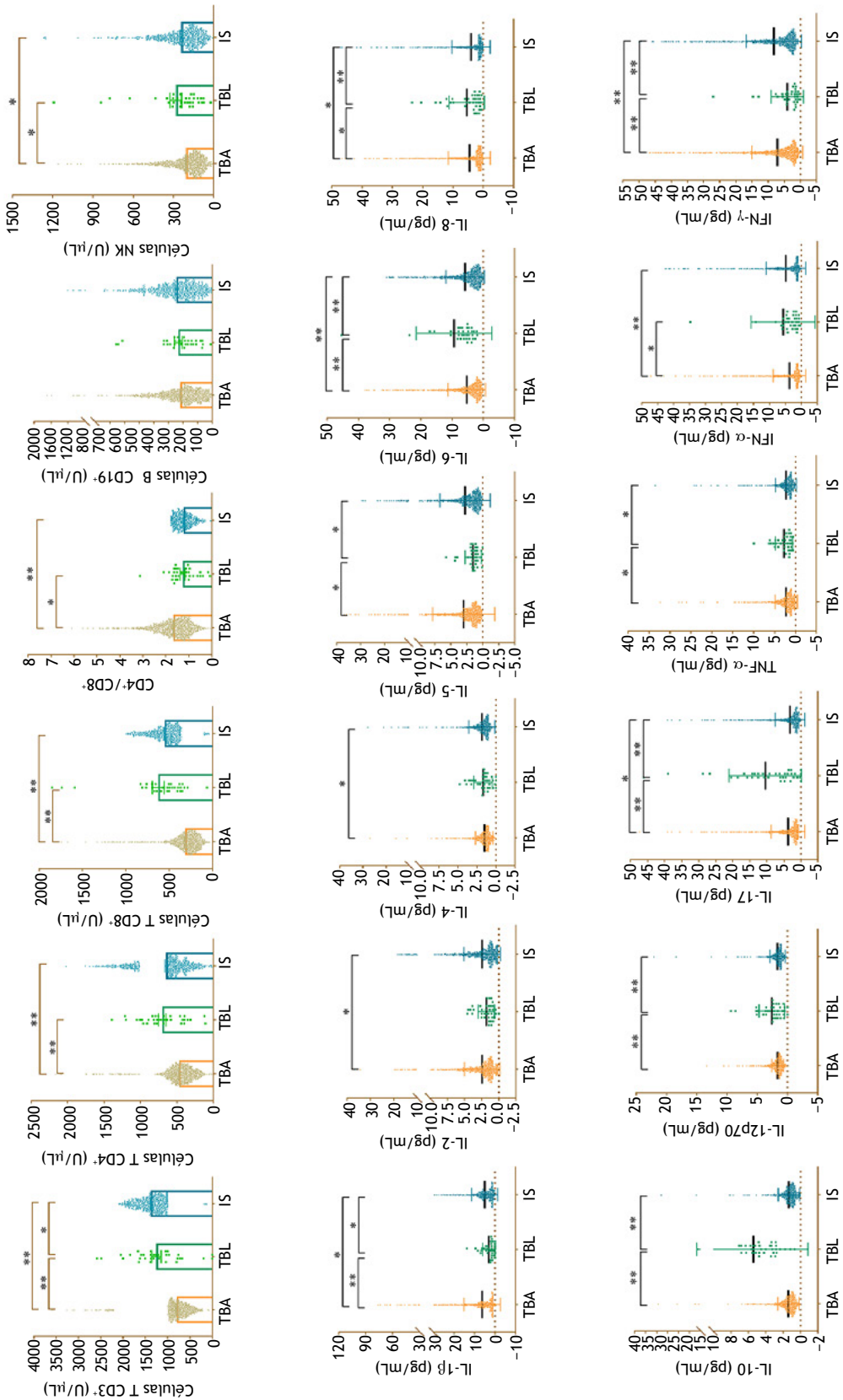


Figura 1. Expressão de linfócitos e citocinas por grupo estudado mostrando que os números absolutos de células T CD3⁺, T CD4⁺, T CD8⁺ e NK no grupo tuberculose ativa (TBA) estavam todos abaixo do normal. O grupo tuberculose latente (TBL) apresentou número de linfócitos acima do normal, com exceção do número absoluto de células T CD3⁺. O grupo TBA apresentou maiores níveis de IL-1β, IL-2, IL-8 e IL-17, mas menores níveis de IL-4, IL-6, TNF-α e IFN-γ do que o grupo indivíduos saudáveis (IS). U: unidades. *p < 0,05. **p < 0,01.

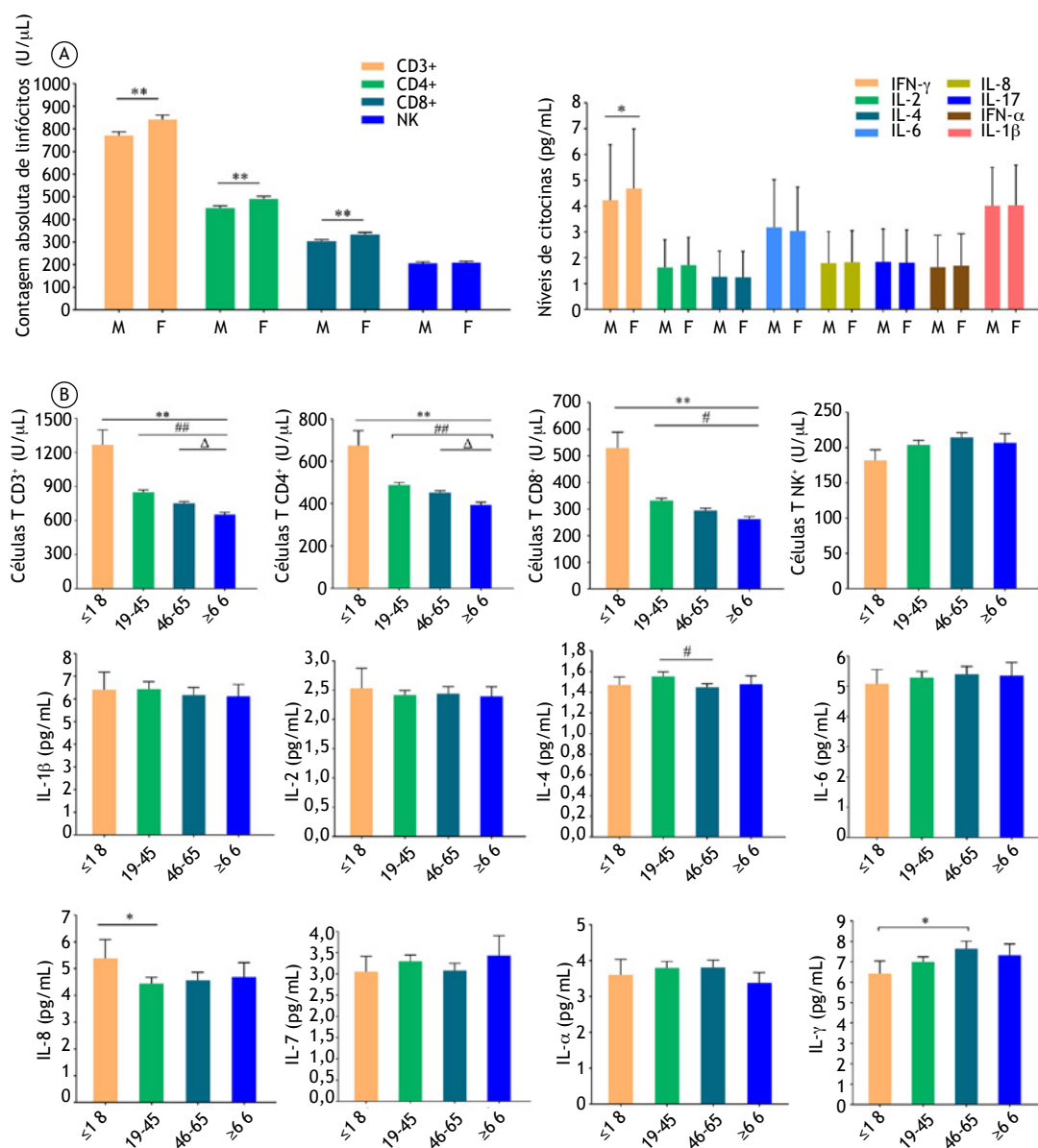


Figura 2. Em A, números absolutos de linfócitos T CD3⁺, T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes com tuberculose ativa mostrando diferenças significativas entre homens e mulheres, com exceção das células NK. Não houve diferenças significativas nos níveis de citocinas entre pacientes do sexo masculino e feminino, com exceção dos níveis de IFN- γ . Em B, números absolutos de linfócitos T CD3⁺, T CD4⁺ e T CD8⁺ mostrando diferenças significativas entre as faixas etárias (em anos) de pacientes com tuberculose ativa. Os níveis globais de citocinas não diferiram significativamente entre as faixas etárias. U: unidades; M: sexo masculino; e F: sexo feminino. *p < 0,05. **p < 0,01.

Para investigar os fatores associados à influência dos linfócitos T e das citocinas na TBA e na TBL, buscamos fatores estatisticamente diferentes entre os grupos TBA, TBL e IS para serem incluídos na análise de fator de impacto (Figura 1). Os resultados da regressão logística mostraram que números absolutos reduzidos de células T CD3⁺, T CD8⁺ e NK e níveis reduzidos de expressão de IL-4 e IFN- γ foram fatores de influência independentes para TBA (Figura 4A). Níveis reduzidos de expressão de IL-1, IL-5 e IFN- γ e níveis aumentados de expressão de IL-12p70 foram fatores de influência independentes para TBL (Figura

4B). Esses fatores de influência são um guia para o diagnóstico e diferenciação da TBA e TBL.

Para avaliar o valor diagnóstico e preditivo dos fatores associados que têm impacto na TBA e na TBL, foram realizadas análises ROC desses fatores. Os resultados mostraram que a contagem absoluta de linfócitos T CD3⁺ e T CD8⁺ e fatores combinados (a sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, de 0,955 e 0,993; 0,774 e 0,955; e 0,951 e 0,977) foram significativamente mais valiosas para o diagnóstico da TBA do que o número absoluto de células NK e os níveis de IL-4 e IFN- γ (Figura 5A). No que tange

à análise ROC para TBL, os níveis de expressão de IL-12p70 e IFN- γ e fatores combinados apresentaram valor diagnóstico (a sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, de 0,568 e 0,862; 0,493 e 0,908; e 0,649 e 0,725), sendo que fatores combinados apresentaram o maior valor diagnóstico (Figura 5B).

DISCUSSÃO

A tuberculose é uma doença inflamatória cuja evolução ou cura é amplamente determinada pela força relativa do Mtb contra o sistema imunológico do hospedeiro, e, portanto, considera-se que seja causada por uma resposta imune desequilibrada à infecção por Mtb.⁽⁸⁾ A imunidade em pacientes com tuberculose é dominada pela imunidade celular, na qual se acredita que as células T desempenhem um papel vital na contenção da infecção por Mtb para controlar a infecção direta ou indiretamente. As citocinas do organismo são uma parte vital do sistema imunológico como mensageiras, e seu papel na luta contra a invasão do Mtb é complexo e multifacetado, sendo influenciado por diferentes estados do hospedeiro.⁽⁹⁾ Portanto, é necessária uma exploração abrangente e sistemática da relação dos linfócitos e citocinas com a infecção por Mtb para fornecer uma base teórica para melhor

compreensão do estado imunológico de pacientes com tuberculose por meio da detecção e diagnóstico baseados em imunologia.

O presente estudo mostrou que o número absoluto de linfócitos T foi menor nos pacientes com TBA do que nos IS. A diferença foi estatisticamente significativa, tendo os pacientes com TBA um pior estado imunológico do que a população saudável. Os números absolutos de células T CD4⁺, T CD8⁺ e NK foram maiores nos pacientes com TBL em comparação com os IS, embora essa diferença não tenha sido significativa; no entanto, o número de células T disponíveis no sangue periférico pode ajudar a avaliar a evolução da infecção.⁽¹⁰⁾ Este estudo também mostrou que pacientes do sexo feminino com TBA são mais imunocompetentes do que pacientes do sexo masculino. Isso é consistente com os achados de um estudo anterior sobre diferenças de gênero na função imunológica.⁽¹¹⁾ Além disso, a função imunológica do paciente diminui gradualmente com a idade. Por outro lado, no que tange às respostas inflamatórias mediadas por citocinas, as diferenças de expressão com relação à idade e sexo não foram significativas. Nossos resultados mostraram que os níveis de algumas citocinas, tais como IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10 e TNF- α , diferiram na TBA e TBL. O motivo desse fenômeno é que as citocinas produzidas em resposta à infecção por Mtb podem reduzir sua resposta imune para limitar o dano tecidual, e a superprodução de citocinas pode levar à falha no controle da infecção.⁽¹²⁾ Isso pode nos fornecer ideias para identificar TBA e TBL.

Um fator essencial no controle da tuberculose são as características das células T CD4⁺ que reagem após a infecção.⁽¹³⁾ Em geral, as células T CD4⁺ produzem mais de uma citocina, especialmente as do tipo Th1 (IFN- γ e TNF- α), que se acredita estarem associadas a respostas imunes protetoras e desempenharem um papel essencial na imunidade antituberculose.⁽¹⁴⁾ Nossos dados mostraram que a TBA tem níveis significativamente elevados de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ). Essas são citocinas específicas para antígenos de Mtb.⁽¹⁵⁾ Assim, nosso estudo confirma o papel vital das células Th1 na patogênese da tuberculose e sugere que a ocorrência de células Th1 pode ser

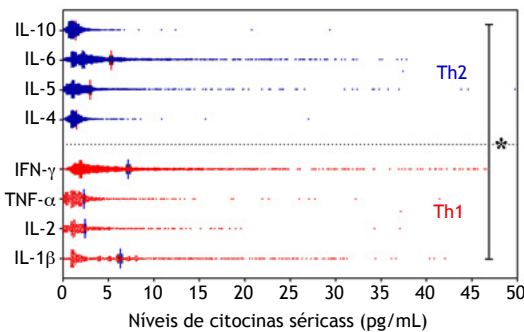


Figura 3. No grupo tuberculose ativa, os níveis de citocinas do tipo Th1 foram maiores do que os de citocinas do tipo Th2. O gráfico de pontos mostra a média e o erro-padrão de cada nível de citocinas. Diferenças entre os níveis globais de citocinas Th1/Th2 foram analisadas por meio do teste t aninhado. *p < 0,05.

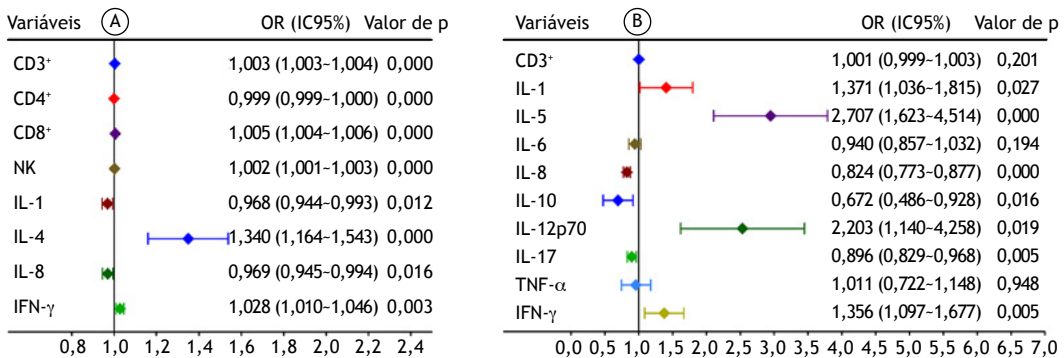


Figura 4. Em A, análise de regressão logística mostra que números absolutos reduzidos de células T CD3⁺, T CD8⁺ e NK e níveis reduzidos de expressão de IL-4 e IFN- γ foram fatores de influência independentes para tuberculose ativa (p < 0,05). Em B, a análise mostra que níveis reduzidos de expressão de IL-1, IL-5 e IFN- γ e níveis aumentados de expressão de IL-12p70 foram fatores de influência independentes para tuberculose latente (p < 0,05).

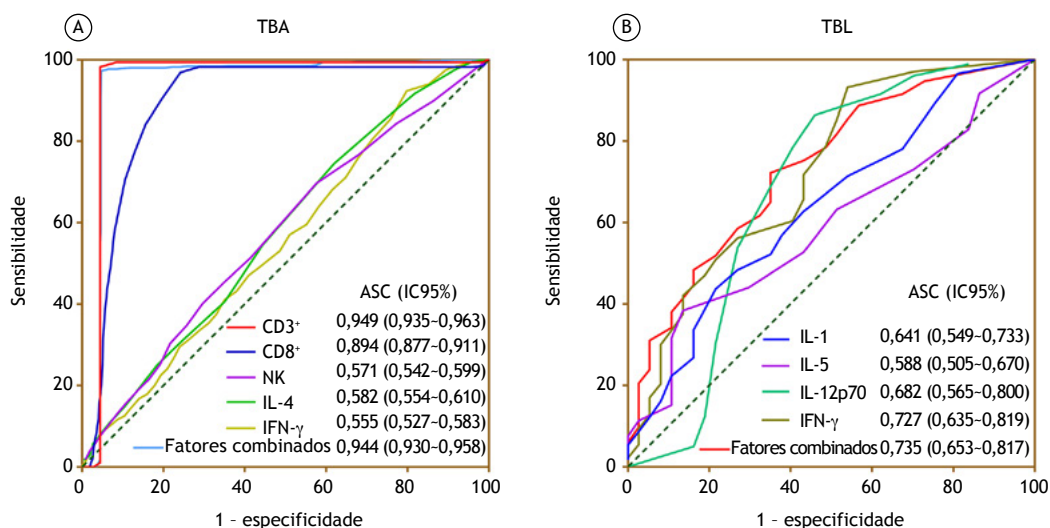


Figura 5. Em A, curvas ROC para tuberculose ativa (TBA). A contagem absoluta de linfócitos T CD3⁺, T CD8⁺ e de fatores combinados apresentaram alto valor diagnóstico para TBA ($p < 0.01$). Em B, curvas ROC para tuberculose latente (TBL). Os níveis de expressão de IL-12p70, IFN-γ e de fatores combinados apresentaram valor diagnóstico para avaliação de TBL, Fatores combinados tiveram o maior valor diagnóstico ($p < 0.01$).

específica para Mtb. No entanto, maiores quantidades de citocinas Th1 podem levar a doença mais grave que pode refletir um aumento da carga bacteriana.⁽¹⁶⁾ Em conclusão, nosso estudo sugere que as citocinas expressas por Th1 desempenham um papel vital na patogênese da TBA.

Pode-se especular sobre os correlatos de risco de TBA a partir do número absoluto de subpopulações de linfócitos T e dos níveis de algumas citocinas. A análise de regressão logística mostrou que contagens absolutas significativamente menores de células T CD3⁺, T CD8⁺ e NK e níveis significativamente menores de expressão de IL-4 e IFN-γ tiveram influência independente na TBA, podendo ser utilizados como evidência de potenciais biomarcadores para a vigilância da tuberculose. Para identificar a TBL, também foram analisados os fatores de influência, sendo que os resultados sugerem que os fatores de influência de doenças relacionadas são em sua maioria diferentes; isso pode ser uma referência para o diagnóstico diferencial de TBA e TBL. Para avaliar o valor diagnóstico e preditivo desses fatores de influência, foi realizada uma análise ROC. Os resultados mostraram que a contagem absoluta de linfócitos T CD3⁺ e T CD8⁺ e fatores combinados foram significativamente mais valiosas, sensíveis e específicas para o diagnóstico da TBA do que os níveis de expressão de IL-4, IL-12p70 e IFN-γ, e que fatores combinados são valiosos na avaliação diagnóstica da TBL. O valor diagnóstico desses biomarcadores também pode ser

avaliado a partir da sensibilidade e especificidade das curvas ROC. Quando considerados em conjunto, esses fatores têm maior valor no diagnóstico de infecção por Mtb ou TBA.

Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que linfócitos T e citocinas séricas são indicadores de referência essenciais para a avaliação do estado imunológico de pacientes com TBA. Os números absolutos de células T CD3⁺, T CD8⁺ e NK e os níveis de expressão de IL-4 e IFN-γ podem ser biomarcadores úteis na predição e diagnóstico da tuberculose. Esses marcadores, especialmente os fatores combinados, desempenham um papel de referência no diagnóstico e tratamento da tuberculose.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

ZM: concepção do estudo; redação, edição e revisão do manuscrito; análise dos softwares. SL: análise dos dados; preparação do esboço original; metodologia; análise estatística. YL, CL e XW: coleta de dados; observação experimental. XT, RD e SZ: operação dos testes. LW: aquisição de financiamento; edição e revisão do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final do manuscrito.

CONFLITOS DE INTERESSE

Nenhum declarado.

REFERÊNCIAS

1. Netea MG, Crevel RV. BCG-induced protection: effects on innate immune memory. *Semin Immunol.* 2014;26(6):512-517. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.006>
2. World Health Organization [homepage on the Internet]. Geneva: WHO; c2022 [updated 22 Oct 27; cited 2022 Nov 1]. Global Tuberculosis Report 2022. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>
3. La Manna MP, Shekarkar-Azgoni M, Badami GD, Tamburini B, Dieli C, Di Carlo P, et al. Impact of *Mycobacterium tuberculosis* Infection on Human B Cell Compartment and Antibody Responses. *Cells.*

- 2022;11(18):2906. <https://doi.org/10.3390/cells11182906>
4. Ritter K, Behrends J, Erdmann H, Rousseau J, Hölscher A, Volz J, et al. Interleukin-23 instructs protective multifunctional CD4 T cell responses after immunization with the Mycobacterium tuberculosis subunit vaccine H1 DDA/TDB independently of interleukin-17A [published correction appears in J Mol Med (Berl). 2021 Sep 27;]. J Mol Med (Berl). 2021;99(11):1585-1602. <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02100-3>
 5. Pearl JE, Saunders B, Ehlers S, Orme IM, Cooper AM. Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse. Cellular Immunol. 2001;211(1):43-50. <https://doi.org/10.1006/cimm.2001.1819>
 6. Kumar NP, Moideen K, Banurekha VV, Nair D, Babu S. Plasma Proinflammatory Cytokines Are Markers of Disease Severity and Bacterial Burden in Pulmonary Tuberculosis. Open Forum Infect Dis. 2019;6(7):ofz257. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz257>
 7. Talat N, Shahid F, Perry S, Dawood G, Hussain R. Th1/Th2 cytometric bead array can discriminate cytokine secretion from endogenously activated cells in pulmonary disease, recent and remote infection in tuberculosis. Cytokine. 2011;54(2):136-143. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.01.012>
 8. Vyas SP, Goswami R. Striking the right immunological balance prevents progression of tuberculosis. Inflamm Res. 2017;66(12):1031-1056. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1081-z>
 9. Lewinsohn DM, Lewinsohn DA. The Missing Link in Correlates of Protective Tuberculosis Immunity: Recognizing the Infected Cell. Front Immunol. 2022;13:869057. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.869057>
 10. Urdahl KB, Shafiani S, Ernst JD. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. Mucosal Immunol. 2011;4(3):288-293. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.10>
 11. Takahashi T, Iwasaki A. Sex differences in immune responses. Science. 2021;371(6527):347-348. <https://doi.org/10.1126/science.abe7199>
 12. Kaplan G, Freedman VH. The role of cytokines in the immune response to tuberculosis. Res Immunol. 1996;147(8-9):565-572. [https://doi.org/10.1016/S0923-2494\(97\)85223-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2494(97)85223-6)
 13. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. Annu Rev Immunol. 2013;31:475-527. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>
 14. Marshall NB, Swain SL. Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:954602. <https://doi.org/10.1155/2011/954602>
 15. Kathamuthu GR, Moideen K, Sridhar R, Baskaran D, Babu S. Enhanced Mycobacterial Antigen-Induced Pro-Inflammatory Cytokine Production in Lymph Node Tuberculosis. Am J Trop Med Hyg. 2019;100(6):1401-1406. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0834>
 16. Kathamuthu GR, Moideen K, Baskaran D, Banurekha VV, Nair D, Sekar G. Tuberculous Lymphadenitis Is Associated with Enhanced Baseline and Antigen-Specific Induction of Type 1 and Type 17 Cytokines and Reduced Interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 at the Site of Infection. Clin Vaccine Immunol. 2017;24(5):e00045-17. <https://doi.org/10.1128/CVI.00045-17>