

**Efeitos da metformina no perfil inflamatório em pacientes com tuberculose e diabetes tipo 2**

**Effects of metformin on the inflammatory profile in patients with tuberculosis and type 2 diabetes**

DOI:10.34117/bjdv6n12-015

Recebimento dos originais:09/11/2020

Aceitação para publicação:02/12/2020

**Thabata Alves Moniz de Aragão Oliveira**

Graduanda em Medicina pela Universidade Salvador (UNIFACS)

Endereço: Rua Professora Guiomar Florence, número 74, edifício High Tower, Parque Bela Vista, Salvador, Bahia, Brasil

E-mail: thabata.moniz@gmail.com

**María Belen Arriaga Gutiérrez**

Doutoranda em Patologia Humana pela Universidade Federal da Bahia (UFBA). Pesquisadora do Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz; Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil

Endereço: Rua Waldemar Falcão, número 121, Candeal, Salvador, Bahia

E-mail: mbag711@gmail.com

**Nathella Pavan Kumar**

Ph.D. em Imunologia. Pesquisador National Institutes of Health—NIRT— International Center for Excellence in Research, Chennai, India

Endereço: National Institute for Research in Tuberculosis, Mayor Sathyamoorthy Road, Chetpet, Chennai-600031

E-mail: pavankumarn@nirt.res.in

**Subash Babu**

Ph.D em Bioquímica. Pesquisador pelo National Institutes of Health—NIRT —International Centre for Excellence in Research. Laboratory of Parasitic Diseases, National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health

Endereço: NIH Institute and Center Contact Information, 9000 Rockville Pike, 20892, Bethesda, MD, United States

E-mail: sbabu@mail.nih.gov

**Vijay Viswanathan**

PhD em nefropatia diabética e Diabetes tipo 2. Pesquisador pelo M V Hospital for Diabetes Royapuram Chennai; M.V. Hospital for Diabetes & Prof M Viswanathan Diabetes Research Centre

Endereço: M V Hospital for Diabetes, Madha Church St, Pudumanaikuppam, Royapuram, Chennai, Tamil Nadu 600013, Índia

E-mail: drvijay@mvediabetes.com

**Kiyoshi Ferreira Fukutani**

Pós-Doutorado pela Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil. Pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil

Endereço: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - BA. Rua Waldemar Falcão - lado ímpar, Candeal, 40296710 - Salvador, Bahia, Brasil

E-mail: ferreirafk@gmail.com

**Hardy Kornfeld**

Professor, Médico pneumologista com Fellowship em Virologia molecular. Pesquisador responsável pelo The Kornfeld Lab, Department of Medicine in University of Massachusetts Medical School  
Endereço completo: University of Massachusetts Memorial Medical Center - University Campus, LRB-303, 55 Lake Avenue North, Worcester, MA 01605

Email: hardy.Kornfeld@umassmed.edu

**Bruno de Bezerril Andrade**

Professor com Pós-Doutorado pelo National Institutes of Health, NIH, Estados Unidos. Pesquisador na Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil. National Institutes of Health, NIH, Estados Unidos.

Endereço completo: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - BA. Rua Waldemar Falcão - lado ímpar, Candeal, 40296710 - Salvador, BA - Brasil

E-mail: brunobezerril@gmail.com

**RESUMO**

O diabetes mellitus (DM) aumenta o risco de tuberculose pulmonar (TB) e desfechos adversos ao tratamento. Sabendo que a metformina é a droga mais utilizada no controle da DM, diversos estudos sugerem um efeito pleiotrópico que aumenta a resposta imunológica contra o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) através da modulação da resposta inflamatória em pacientes com TB. Assim, o objetivo geral do presente estudo foi investigar os efeitos da metformina na resposta imunológica e inflamatória contra o *Mycobacterium tuberculosis* durante o tratamento para TB em pacientes diabéticos. Trata-se de um estudo de coorte prospectivo com pacientes atendidos em centros conveniados de referência em Chennai, no Sul da Índia, no período entre 2016 a 2017. Os dados clínicos e imunológicos foram coletados em 4 diferentes períodos (avaliação inicial, segundo mês, sexto mês e decimo oitavo mês). Os pacientes com tuberculose e diabetes (TBDM) foram divididos de acordo com o uso de metformina, TBDM metformina (Met) 29 pacientes e o TBDM sem uso de metformina (NMet) 14 pacientes. Foram analisadas variáveis sociodemográficas, antropométricas e os hábitos de vida. Os pacientes TBDM Met eram mais velhos, com predominância do sexo masculino em ambos os grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao IMC, tabagismo e etilismo. Foram mensuradas 17 citocinas plasmáticas e fatores de crescimento. Houve uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de 2 citocinas, a IL-17F no mês 2 e IL-5 no mês 6. A associação da HbA1c com os biomarcadores em cada tempo também foi examinada. As análises indicaram que os indivíduos com TBDM Met apresentaram uma melhor resposta a infecção pelo Mtb, produzindo citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatória a depender do momento específico no tratamento, indicando assim que o uso da metformina pode ter gerado um menor estado inflamatório após o tratamento para tuberculose.

**Palavras chaves:** Tuberculose, Metformina, Diabetes mellitus, Inflamação.

**ABSTRACT**

Diabetes mellitus (DM) increases the risk of pulmonary tuberculosis (TB) and adverse treatment outcomes. Knowing that metformin is the most used drug to control DM, several studies suggest a pleiotropic effect that enhances the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) by modulating the inflammatory response in TB patients. Thus, the general objective of the present study was to investigate the effects of metformin on the immune and inflammatory response against *Mycobacterium tuberculosis* during treatment for TB in diabetic patients. This is a prospective cohort study with patients attended at referral centers in Chennai, South India, from 2016 to 2017. Clinical and immunological data were collected in 4 different periods (baseline, second month, sixth month and eighteenth month). The patients with tuberculosis and diabetes (TBDM) were divided according to the use of metformin, TBDM metformin (Met) 29 patients and TBDM without metformin use (NMet) 14 patients. Sociodemographic, anthropometric and lifestyle habits were analyzed as variables. TBDM Met patients were older, there was a male predominance in both groups. There was no statistically significant difference regarding BMI, smoking and alcoholism. Seventeen plasma cytokines and growth factors were measured. There was a statistically significant difference in the levels of 2 cytokines, IL-17F at month 2 and IL-5 at month 6. The association of HbA1c with biomarkers at each time was also examined. The analyzes indicated that individuals with TBDM Met had a better response to Mtb infection, producing proinflammatory or anti-inflammatory cytokines depending on the specific time of treatment, thus indicating that the use of metformin may have generated a lower inflammatory state after the treatment for tuberculosis.

**Keywords:** Tuberculosis, Metformin, Diabetes Mellitus, Inflammation.

**1 INTRODUÇÃO**

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa, com elevada morbimortalidade em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial esteja infectada com *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Ocorrem, cerca de 9.6 milhões de novos casos e 1.5 milhões de mortes devido à TB por ano. O índice de propagação é maior em países em desenvolvimento e o Brasil faz parte do grupo dos 22 países priorizados pela OMS<sup>1</sup>.

O comprometimento da imunidade, frente ao HIV, diabetes mellitus (DM), tabagismo e desnutrição, aumentam o risco da progressão da infecção latente por tuberculose (LTBI) para a doença ativa<sup>2</sup>. E estima-se que cerca de 15% dos casos de TB sejam atribuíveis a DM<sup>2,3</sup>.

Como a DM é uma doença de alcance mundial, ela se apresenta como mais um fator para disseminação da TB. Segundo a OMS, o número de pessoas vivendo com DM quadruplicou em comparação com o ano 1980, que alcançou 422 milhões de pessoas em 2014, especialmente em países em desenvolvimento onde a tuberculose e a infecção pelo HIV representam uma das cinco principais causas de óbito<sup>1</sup>.

A DM diminui a resposta imunológica o que facilita o desenvolvimento de doenças infecciosas, incluindo infecção por Mtb<sup>4</sup>. A associação entre TB e DM vem sendo muito investigada e diversos

estudo já comprovaram os efeitos danosos de um estado inflamatório crônico devido a DM no combate a uma doença que exige tanto do sistema imune como a tuberculose. Seicentos et al., mostrou que o risco de um paciente diabético desenvolver TB está aumentado cerca de 2,44 a 8,33, comparado com um paciente não diabético<sup>2-5</sup>.

A Índia possui uma alta carga de pacientes com TB e DM, sendo o segundo país com maior número de casos de DM no mundo. Já foi demonstrado que a comorbidade TB e DM aumenta as chances de baciloscopia positiva, cavitação, atraso na conversão da expectoração, falhas terapêuticas e recorrência de TB<sup>4-6-10</sup>.

A droga mais utilizada no tratamento da DM tipo 2 na população mundial é a metformina (met), que é o medicamento mais efetivo no combate a resistência insulínica. A metformina é um composto farmacológico conhecido como dimetilbiguanida e tem revelado diversos efeitos fisiológicos e bioquímicos importantes, como estimular a atividade quinase dos receptores de insulina e melhorar a função das enzimas envolvidas nos mecanismos de sinalização intracelular da insulina<sup>9-7</sup>.

Os dados de Singhal<sup>11</sup> sugerem que tanto a imunidade protetora como a imunidade patológica podem ser moduladas independentemente pela metformina durante a infecção por Mtb. A metformina atua aumentando a imunidade específica do hospedeiro, reduzindo a inflamação, promovendo a resolução da doença e melhorando os resultados do tratamento.

Dessa forma, estudos brasileiros e indianos buscam entender os mecanismos e as consequências da interação entre essas duas patologias, a fim de definir prioridades de pesquisa e fornecer intervenções com possíveis agentes imunomoduladores para tratamento adjuvante da TB.

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da metformina na resposta imunológica e inflamatória contra o *Mycobacterium tuberculosis* durante o tratamento para TB em pacientes diabéticos.

## **2 MATERIAS E MÉTODOS**

### **Desenho do Estudo**

Estudo de coorte prospectivo de pacientes atendidos em centros conveniados de referência em Chennai, no Sul da Índia, diagnosticados com tuberculose e recrutados em consortium multinacional conhecido como RePORT e inscritos no estudo EDOTS<sup>31</sup>, no período entre 2016 a 2017, financiado pelo Ministério da Saúde e o National Institutes of Health, dos Estados Unidos da América.

### **População do Estudo**

Foram recrutados 87 pacientes (44 com tuberculose, 43 com tuberculose e diabetes, desses 29 estavam em uso de metformina [TBDM Met]; e 14 pacientes tuberculosos diabéticos sem uso de metformina [TBDM NMet]). Os pacientes que foram diagnosticados com diabetes durante o estudo são classificados como NDM (newly diagnosed diabetics – diabéticos recém diagnosticados) e o outro grupo foi classificado como KDM (known diabetic – diabéticos conhecidos).

Os critérios de inclusão foram: idade acima de 25 anos, homens e mulheres, com TB confirmada por cultura de escarro positiva, baciloscopia e radiografia de tórax compatível e aderência ao tratamento.

Os critérios de exclusão foram: tratamento prévio para TB; mais de sete dias de tratamento para o episódio de TB atual; mais de sete doses de uma fluoroquinolona no prazo de 30 dias, TB resistente a múltiplos fármacos; grávidas; soro positivo para o HIV, ou uso de medicamentos imunossupressores.

Os participantes foram classificados com DM quando apresentaram: glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL, em duas ocasiões; sintomas de diabetes mais glicemia casual, medida igual ou maior que 200 mg/dL; glicemia igual ou superior a 200 mg/dL duas horas após uma carga de 75 g de glicose por via oral durante um teste oral de tolerância à glicose (TOTG); hemoglobina glicada A1c (HbA1c)  $\geq 6,5\%$ , realizada em laboratório.

Os participantes foram classificados como normoglicêmico pela glicose plasmática  $< 140$  mg/dL duas horas após uma carga de 75 g de glicose por via oral durante um teste oral de tolerância à glicose (TOTG) de acordo com Critérios da Organização Mundial da saúde (OMS)<sup>1</sup>.

O uso de cigarro e álcool foi autorreferido e dividido entre consumo atual, passado ou nunca ter feito uso.

### **Definição de variáveis**

As seguintes covariáveis sociodemográficas foram avaliadas: Idade (25-75), sexo (masculino, feminino), tabagismo e etilismo. Análise clínica do paciente como alteração pulmonar, escore do raio-x de tórax, resultado da hemoglobina glicada, índice de massa corpórea (IMC). Expressas como frequência absoluta e relativa ou como mediana e Intervalo interquartil (IQR).

Os parâmetros imunológicos analisados foram interferon- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL) 1- $\beta$  (IL-1b), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF). Níveis plasmáticos de fator de crescimento transformador- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ ;) e IL-17F foram medidos por ELISA.

**Dados Avaliados**

Características sociodemográficas e clínicas foram recolhidas durante o recrutamento dos pacientes e armazenados no banco de dados do REPORT para análise. Dados bioquímicos e microbiológicos, como: avaliações do escarro que incluíram baciloscopia, cultura e coletas de sangue foram realizadas nos mesmos intervalos para a mensuração de parâmetros hematológicos e dosagem de mediadores plasmáticos utilizando o Luminex.

Os parâmetros plasmáticos foram medidos em amostras de participantes dos grupos TBDM Met e TBDM NMet no início do estudo (baseline), durante o tratamento (mês 2), na conclusão do tratamento (6 meses) e um ano após o término do tratamento de TB (mês 18). A mensuração dos níveis glicêmicos foi feita por meio da hemoglobina. Avaliações fenotípicas e dosagem de mediadores plasmáticos foram realizadas no sangue por ensaio citométrico multiparâmetro ou ELISA.

**Análise de dados**

As variáveis quantitativas foram expressas por mediana e intervalo interquartil (IQR) e as qualitativas por frequência absoluta e relativa.

Para comparação dos dois grupos foram utilizados teste *t* de Student para amostras independentes, Mann-Whitney *U* (comparações de 2 grupos), ou o teste de Kruskal-Wallis (entre 3 grupos ou mais) de acordo com a distribuição da variável em questão. As variáveis qualitativas foram comparadas usando teste exato de Fisher.

Um mapa de calor foi projetado para descrever o padrão geral de expressão de citocinas plasmáticas, quimiocinas e marcadores inflamatórios em pacientes com TBDM usando metformina ( $n = 29$ ) e TBDM sem metformina ( $n = 14$ ). Fold-change foi realizado utilizando a diferença entre as médias obtidas pelo teste *t* múltiplo.

O teste de ANOVA foi realizado para identificar a variabilidade intragrupo e inter-grupos de todas as citocinas. Apenas as citocinas estatisticamente significantes foram demonstradas.

Foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman para testar a associação linear entre as variáveis. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Para a análise de correlação os valores entre 0,10 até 0,30 foram considerados uma correlação fraca; 0,40 até 0,6 correlação moderada e maiores que 0,70 uma correlação forte.

Os pacotes estatísticos GraphPad 7.0 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA), JMP 13.0 (SAS, Cary, NC, USA) e R 3.5.1 (R Foundation, Vienna, Austria), foram utilizados para análise e tabulação dos dados. Os valores foram transformados com  $\log_{10}$ .

### Aspectos Éticos

O projeto foi conduzido de acordo com os princípios expressos na Declaração de Helsinque. O estudo de coorte da Índia foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisa em Diabetes do Prof. M. Viswanathan - Prof. M. Viswanathan Diabetes Research Centre (ECR/51/INST/TN/2013/MVDRC/01). O estudo de coorte do Brasil foi aprovado pelo Comitê de Ética da Maternidade Climático de Oliveira, Universidade Federal da Bahia (CAAE: 0115.0.054.000-09). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), no qual estão garantidos os princípios de autonomia, confidencialidade, equidade e justiça, constando todas as informações referentes à pesquisa, foi assinado por todos os participantes nos dois locais.

### 3 RESULTADOS

#### Características das populações estudadas

Os pacientes recrutados com suspeita de TB foram triados para participar do estudo EDOTS no sistema clínico governamental em Chennai, Índia. Participantes que se adequassem aos critérios de inclusão eram inscritos no estudo, realizando os testes para confirmação da TB e da DM.

Os participantes receberam visitas para acompanhamento mensalmente até o sexto mês e depois trimestralmente até a conclusão do estudo no 18º mês. O estudo piloto dividiu os pacientes em TB e TBDM, para o objetivo desse estudo apenas o grupo TBDM foi utilizado, sendo dividido em Met (em uso de metformina) e NMet (sem uso de metformina).

As variáveis demográficas, antropométricas e referente aos hábitos de vida podem ser visualizadas na tabela 1. Comparando o grupo TBDM Met e o grupo NMet é possível perceber que os pacientes TBDM Met tendem a ser mais velhos, idade 48 (IQR: 39,0 - 52,0) e 44,5 (IQR: 34,7 - 50,0) respectivamente. Predominância do sexo masculino foi observado em ambos os grupos. Não houve diferença significativa no índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal. A mediana e o intervalo interquartil do IMC, em ambos os grupos está dentro da faixa de peso normal segundo a OMS. Existe uma tendência para maior circunferência abdominal em mulheres no grupo Met e para os homens no grupo NMet, apesar de não ter significância estatística as mulheres do grupo TBDM Met tiveram uma mediana de 93 cm, considerada pela OMS como um fator de risco cardiovascular muito alto. Não houve diferenças significativas entre os grupos TBDM Met e TBDM NMet em relação ao consumo atual ou passado de álcool e tabaco.

Tabela 1: Características gerais da população.

CARACTERISTICAS	TBDM Met (n=29)	TBDM NMet (n=14)	P Valor
<b>KDM - n° (%)</b>	15 (51,7)	13 (92,8)	<b>0,0148</b>
<b>Idade mediana (IQR)</b>	48 (39,0 – 52,0)	44,5 (34,7 – 50,0)	0,3443
<b>Sexo Masculino - n° (%)</b>	23 (79,3)	9 (64,2)	0,4568
<b>IMC - Kg/m2 - mediana (IQR)</b>	19,8 (16,6 - 21,7)	22,3 (15,5 - 24,8)	0,2410
<b>Circunferência Abdominal - mediana (IQR)</b>			
<i>Feminino</i>	93 (73,5 - 94,5)	74 (71,5 - 80,7)	0,1883
<i>Masculino</i>	84 (72,5 - 87,5)	78 (69,0 - 84,5)	0,2576
<b>Status tabagismo - n° (%)</b>			0,7361
<i>Fumante</i>	3 (10,3)	2 (14,3)	
<i>Ex-fumante</i>	7 (24,2)	2 (14,3)	
<i>Nunca fumou</i>	19 (65,5)	10 (71,4)	
<b>Etilismo - n° (%)</b>			0,7165
<i>Etilista</i>	7 (24,1)	4 (28,6)	
<i>Ex-etilista</i>	12 (41,4)	4 (28,6)	
<i>Nunca bebeu</i>	10 (34,5)	6 (42,8)	
<b>Score Radiográfico - mediana (IQR)</b>	40 (22,5 – 60,0)	25 (10,0 - 41,2)	0,0952
<b>Lobo Inferior - n° (%)</b>	11 (37,9)	6 (42,8)	1,0000
<b>Cavitação - n° (%)</b>	7 (24,1)	2 (14,3)	0,6925
<b>Cura Bacteriológica - n° (%)</b>	25 (86,2)	12 (85,7)	0,4677

Nota: Os dados de frequência foram comparados pelo teste exato de Fisher, enquanto as variáveis contínuas (idade, IMC, circunferência abdominal e escore radiográfico) foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. A circunferência abdominal é classificada de acordo com a OMS. Os dados representam mediana e intervalo interquartil (IQR) ou número e frequência (%). P-valor foi considerado significativo se ( $P < 0,05$ ). Abreviaturas: KDM: known diabetic – diabéticos conhecidos; IMC: Índice de Massa Corporal.

O índice de cura do grupo Met é maior do que no grupo NMet, sendo que no grupo Met existiram duas perdas de seguimento e duas recidivas, enquanto no grupo NMet não houve perda de seguimento, mas ocorreram duas recidivas. Não existiu diferenças significativas entre os grupos no escore de gravidade radiográfica da TB, na presença de lesões no lobo inferior ou lesões cavitárias. O grupo Met apresentou menor número de cavidade, no entanto teve o lobo inferior mais acometido e escore radiográfico maior. A HbA1c mediana do grupo Met foi de 9,8 e do grupo NMet 10,1, sem significância estatística nessa comparação (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação bioquímica de pacientes em uso ou não de metformina.

CARACTERISTICAS	TBDM Met (n=29)	TBDM NMet (n=14)	P Valor
HbA1c %	9,8 (6,7 - 11,8)	10,1 (8,2 - 12,9)	0,3383
Glicose de Jejum - mg/dL	146 (110,0 - 263,5)	149,5 (112,2 - 225,2)	0,9032
Leucócitos - (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	9,7 (7,6 - 12,2)	10,0 (8,7 - 11,6)	0,5511
Neutrófilo - (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	6,0 (5,4 - 9,2)	7,1 (5,7 - 8,0)	0,9868
Linfócito - (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1,4 (1,1 - 2,0)	2,0 (1,8 - 2,3)	<b>0,0011</b>
Monócito - (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	0,9 (0,5 - 1,1)	0,8 (0,6 - 1,1)	0,9851
Relação Neutrófilo: Linfócito	4,4 (3,3 - 6,9)	3,4 (3,0 - 3,7)	<b>0,0123</b>
Relação Monócito: HDL Colesterol	27,7 (14,6 - 34,0)	22,9 (14,3 - 32,6)	0,5469
Hemácias - (10 <sup>5</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,8 (4,3 - 5,2)	4,8 (4,4 - 5,4)	0,6860
Hemoglobina - g/dL	12,6 (11,4 - 4,7)	12,7 (11,7 - 14,1)	0,8127
Hematócrito %	38 (35,0 - 43,5)	38,5 (36,7 - 42,0)	0,3698
Plaquetas - (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	318 (260,0 - 412,0)	373 (305,2 - 468,7)	0,2187
Triglicerídeos - mg/dL	102 (87,0 - 128,0)	104,5 (99,0 - 21,7)	0,6308
Colesterol Total - mg/dL	176 (141,5 - 205,0)	162,5 (135,7 - 210,2)	0,8227
HDL Colesterol - mg/dL	35 (29,5 - 38,5)	37,5 (34,0 - 43,2)	0,1857
LDL Colesterol - mg/dL	95 (75,0 - 120,5)	91,5 (74,2 - 127,0)	0,9337
VLDL Colesterol - mg/dL	37 (29,5 - 49,5)	35,5 (22,0 - 43,2)	0,3254
Ureia Plasmática - mg/dL	16 (12,0 - 23,0)	16 (14,0 - 17,0)	0,3572
Creatinina Plasmática - mg/dL	0,8 (0,7 - 0,9)	0,8 (0,7 - 0,9)	0,3769
Bilirrubina total - mg/dL	0,6 (0,4 - 0,8)	0,5 (0,4 - 0,9)	0,9840
Proteína total - g/dL	8 (7,6 - 8,6)	8,3 (7,6 - 8,8)	0,4679
Albumina - g/dL	3,9 (3,6 - 4,3)	4,0 (3,8 - 4,3)	0,4512
Globulina - g/dL	4,2 (3,7 - 4,7)	4,25 (3,9 - 4,8)	0,5082
TGO - UI/L	15 (12,5 - 19,5)	14 (11,5 - 22,0)	0,6855
TGP - UI/L	12 (6,5 - 19,0)	14 (9,7 - 21,2)	0,2703
Fosfatase Alcalina - UI/L	296 (239,5 - 357,5)	232 (201,2 - 335,0)	0,1694
Vitamina D - ng/dL	15 (9,6 - 25,0)	15,5 (7,0 - 2,0)	0,5682

Nota: Os dados representam mediana e intervalo interquartil, as variáveis foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. P-valor foi considerado significativo se (P <0,05).

O estado glicêmico dos pacientes está descrito na tabela 3. Os dois grupos tiveram um controle glicêmico inadequado, pois 79,3% dos pacientes do grupo TBDM Met e 78,6% do grupo TBDM NMet tiveram a glicemia de jejum >100 mg/dl.

Tabela 3: Avaliação do estado glicêmico dos pacientes em ambos os grupos analisados.

CARACTERISTICAS	TBDM Met (n=29)	TBDM NMet (n=14)
<b>HbA1c (%) Tempo 0 - n° (%)</b>		
<7,0	5 (17,3)	1 (7,1)
7,0 - 8,0	6 (20,7)	4 (28,6)
>8,0	18 (62)	9 (64,3)
<b>HbA1c (%) Tempo 6 - n° (%)</b>		
<7,0	13 (44,8)	1 (7,1)
7,0 - 8,0	4 (13,8)	4 (28,6)
>8,0	12 (41,4)	9 (64,3)
<b>HbA1c (%) Tempo 18* - n° (%)</b>		
	<b>23</b>	<b>11</b>
<7,0	8 (34,8)	2 (18,2)
7,0 - 8,0	5 (21,7)	1 (9,0)
>8,0	10 (43,5)	8 (72,8)
<b>Glicemia de Jejum (mg/dl) - n° (%)</b>		
<70	1 (3,4)	1 (7,1)
70 - 100	5 (17,3)	2 (14,3)
101 - 200	10 (34,5)	7 (50,0)
>200	13 (44,8)	4 (28,6)

Nota: \*No 18º mês a variáveis apresentou número diferente de pacientes, pois os dados estavam disponíveis apenas de: 23 pacientes no grupo Met e 11 no grupo NMet.

Não houve diferença nos níveis de triglicerídeos séricos, colesterol total, LDL, HDL, creatinina, bilirrubina, ureia, proteína total, albumina, globulina, TGO, TGP, fosfatase alcalina e vitamina D que apresentou nos dois grupos a mediana abaixo de um limiar comum de insuficiência (20 ng/mL).

O número de linfócitos foi significativamente maior no grupo TBDM NMet ( $p=0,0011$ ), a contagem absoluta de neutrófilos não demonstrou significância estatística, mas a razão neutrófilo/linfócito que é usada como indicador de processo inflamatório e prognóstico de diversas doenças, teve significância estatística ( $p=0,0123$ ). Não houve diferença na mediana de hemácias e hemoglobina (Tabela 2).

Os sintomas mais prevalentes em ambos os grupos demonstrado na tabela 4, foram: tosse em 96,5% no grupo Met e 100% no grupo NMet seguido por dor torácica, febre e perda de peso referida por 92,8% dos pacientes do grupo NMet e 86,2% dos pacientes do grupo Met, apesar das diferenças entre os grupos não houve significância estatística.

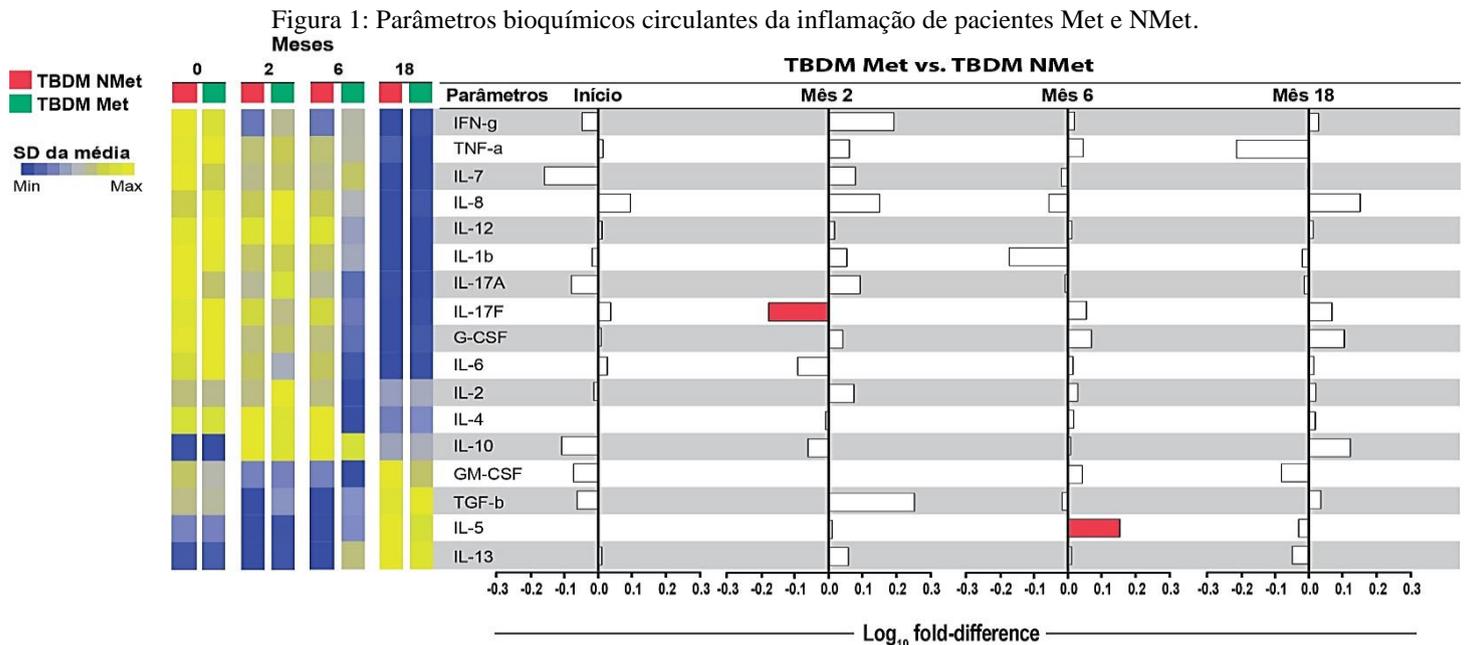
Tabela 4: Sintomas clássicos para TB referidos pelos pacientes dos grupos Met e NMet.

CHARACTERISTICAS	TBDM Met (n=29)	TBDM NMet (n=14)	Valor-P
Tosse - n° (%)	28 (96,5)	14 (100)	0,4820
Dispneia - n° (%)	8 (27,5)	6 (20,6)	0,3048
Sede - n° (%)	15 (51,7)	10 (71,4)	0,1520
Febre - n° (%)	25 (86,2)	13 (92,8)	0,5238
Suor Noturno - n° (%)	12 (17,2)	7 (50,0)	0,5938
Dor Torácica - n° (%)	16 (65,5)	9 (64,2)	0,7593
Parestesia - n° (%)	6 (20,6)	7 (50,0)	<b>0,0406</b>
Perda de peso - n° (%)	25 (86,2)	13 (92,8)	0,4190

Os dados mostram o número absoluto e a frequência em porcentagem de pacientes em cada coluna respectivamente.

### Tendências nos níveis plasmáticos de citocinas entre grupos

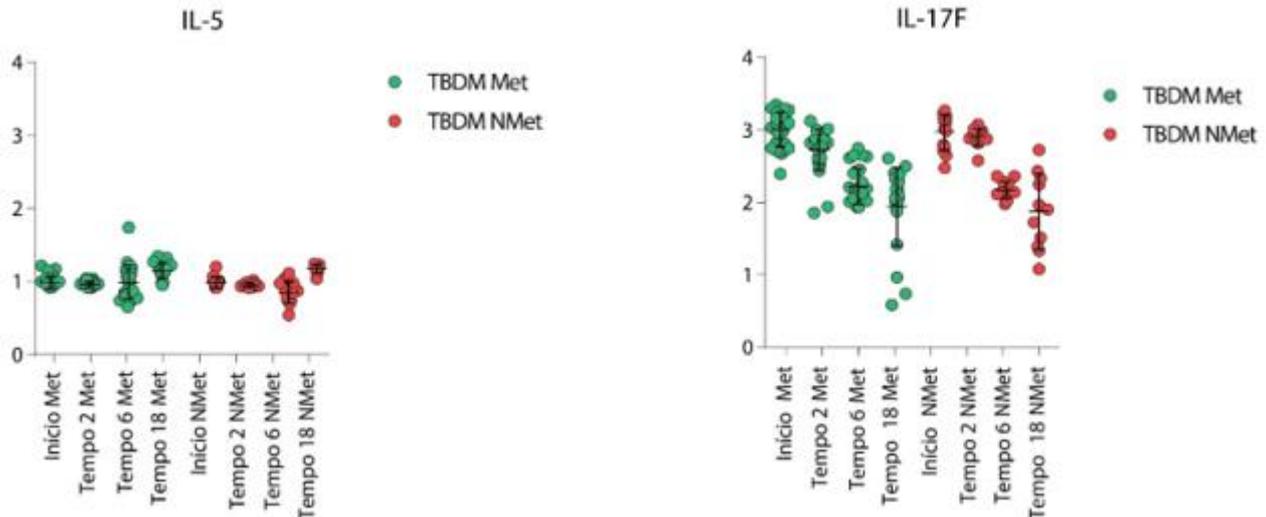
A análise das citocinas plasmáticas responsáveis pelas diferenças entre os grupos TBDM Met e TBDM NMet é mostrada na figura 1.



Os dados foram divididos em 4 grupos de acordo com o mês analisado. Os nomes das citocinas são mostrados à direita do mapa de calor. Painel direito: Uma análise hierárquica de clusters (método de Ward), foi realizada para demonstrar o perfil inflamatório de cada grupo nos diferentes meses durante o tratamento, cada coluna representa um mês estudado. Painel Esquerdo: Fold-change entre os grupos TBDM Me tvs TBDM NMet foi calculado utilizando a escala de expressão para cada biomarcador foi representada usando log<sub>10</sub> da média geométrica de toda a população do estudo. As diferenças entre médias nos níveis de citocinas para TBDM Met e TBDM NMet foram comparadas usando-se o teste t de múltiplos, diferenças estatisticamente significativas são destacadas em vermelho.

Houve uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de 2 citocinas, a IL-17F no mês 2 e IL-5 no mês 6. Para essas citocinas foi avaliado a variabilidade intragrupo e inter-grupos através do teste de ANOVA e estão demonstradas na figura 2.

Figura 2: Distribuição das citocinas IL-17F e IL-5 entre os grupos Met e NMet.



Análise da dispersão entre as citocinas estatisticamente significantes, utilizando ANOVA, os tempos foram unidos para melhor representação gráfica.

No início do estudo não foi possível identificar um padrão organizado entre as citocinas. No 2º e no 6º mês o grupo Met apresenta uma maior diferença nos níveis das citocinas, no entanto não existiu correlação entre os dois meses, pois citocinas que se apresentavam predominantes no grupo Met no segundo mês inverteram de direção no sexto mês. Um ano após o tratamento nota-se que a maioria das citocinas não apresenta diferença em ambos os grupos, excetuando-se a citocina TNF- $\alpha$ , no grupo NMet, que apesar de ter uma diferença expressiva no gráfico não possui significância estatística.

O padrão do nível da IL-17F teve uma diferença significativa no 2º mês, mudando sua magnitude e direção, passando a ser maior em NMet do que em Met diferente do mostrado no primeiro mês e ao longo do estudo. O mesmo aconteceu com IL-6, no entanto esta, diferente da IL-17F não apresentou significância estatística.

Outra citocina com valor de p significativo foi IL-5 no sexto mês, no início do estudo não houve diferença expressiva nos grupos, no segundo mês ela aparece no gráfico mostrando um pequeno aumento no grupo Met, tornando-se mais expressiva no 6º mês nesse mesmo grupo, mudando a sua direção no 18º mês.

Importante citar a TGFb que teve um padrão bem heterogêneo durante o estudo, sendo maior em NMet no início do estudo, tendo um aumento notável, porém não significante em Met no 2° mês, voltando a ser menor em Met no 6° mês e crescendo um pouco no 18° mês.

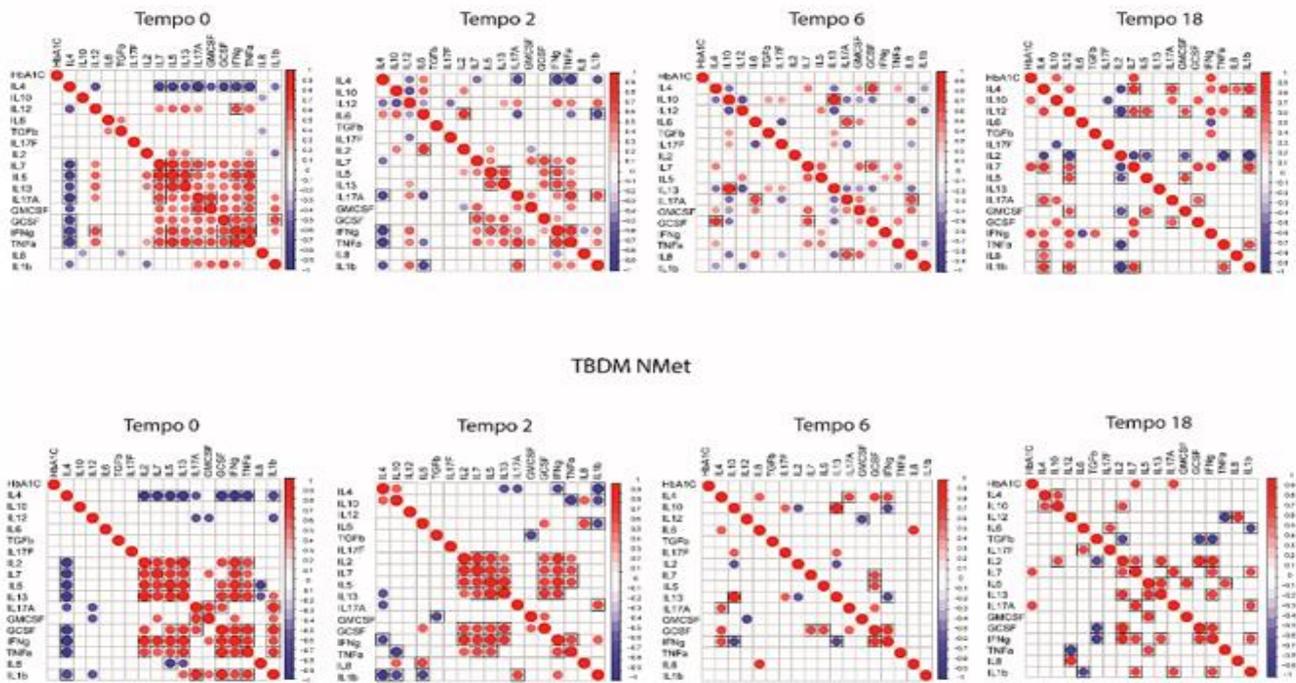
Além da TGFb outras citocinas mudaram de direção durante o tratamento, a IFNg era maior em NMet apenas no início do estudo, TNFa mudou sua direção no 18° mês se tornando maior em NMet, a IL-8 tem uma variação na sua direção no 6° mês, a IL1b apresenta uma mudança na direção no 2° mês, e tem um aumento não significante na sua magnitude no 6° mês que pode estar relacionado com o uso de metformina.

Observando a figura 2 é possível perceber uma maior área de dispersão no 6° mês na IL-5 e do 18° mês na IL-17F. O grupo NMet apresentou um aumento das duas citocinas em questão no 18° mês, após um decréscimo contínuo desde o início do estudo.

**Associação de citocinas plasmáticas com HbA1c**

Para a análise de correlação (figura 3), matrizes de Spearman foram construídas para examinar as associações entre as citocinas em toda a coorte nos dois grupos. A associação da HbA1c com os biomarcadores em cada tempo também foi examinada.

Figura 3: Correlações entre o grupo Met e NMet em todos os tempos.



As matrizes de correlação de Spearman foram construídas para examinar as associações entre HbA1c e a análise imunológica indicada em cada momento do estudo em ambos os grupos. Os valores de classificação de Spearman são mostrados em uma escala de mapa de calor. Pontos vermelhos representam correlações positivas, enquanto pontos azuis representam correlações negativas. Coeficientes  $\rho > 0,70$  foram destacados em quadrados em negrito demonstrando uma correlação forte.

As citocinas identificadas foram estatisticamente significantes e as que obtiveram forte correlações positivas (vermelho) ou negativas (azul) foram marcadas em negrito. É possível perceber as diferenças entre o grupo Met e NMet, pois o grupo Met possui um maior número de correlações significantes em todos os tempos, comparado ao outro grupo.

No primeiro mês em ambos os grupos ocorre predominância de correlações positivas se excetuando a IL-4 que possui maior número de correlações negativas (IL-12, IL-7, IL-5, IL-13, IL-17A, GMCSF, GCSF, INF-g, TNF-  $\alpha$ , IL-1b), esse padrão muda no 18º mês, quando a IL-4 possui correlação negativa apenas com IL-2 no grupo Met.

A HbA1c não manteve correlação significativa em ambos os grupos nos tempo 0 e 4, sendo demonstrado apenas no tempo 18 correlações positivas no grupo Met com as citocinas IL-7, INF-g e IL-10, já no grupo NMet a correlação ocorreu com a citocinas IL-17A e IL-7. A IL-7 que apareceu em ambos os grupos, é conhecida por manter fortes respostas imunes celulares por meses<sup>12</sup>.

#### **4 DISCUSSÃO**

Neste estudo não foi evidenciado associação entre o uso de metformina e melhora no estado inflamatório, no entanto os pacientes com TBDM Met mostraram uma tendência de melhora na resposta inflamatória a infecção pelo Mtb, durante o período de tratamento da tuberculose.

A metformina vem sendo estudada devido a seu mecanismo de ação que propicia o aumento da produção de mROS e a acidificação do fagossomo micobacteriano nas células hospedeiras. Possui efeito anti-inflamatório, mediado pela ativação da AMPK uma serina/tirosina quinase, que atua como um regulador negativo da inflamação. O tratamento com met também promove a expansão de células T secretoras de IFN-g. Esses efeitos tornam a met uma droga promissora no tratamento anti-TB em pacientes diabéticos e não diabéticos<sup>11,14-15</sup>.

Singhal et al<sup>11</sup>, mostrou os benefícios desse fármaco em experimento com ratos e analisando retrospectivamente uma coorte com 296 pacientes com TB e DM. De acordo com a pesquisa, a met inibe o crescimento intracelular de Mtb, restringe a imunopatologia da doença e aumenta a eficácia de drogas convencionais anti-TB. Em ratos infectados pelo Mtb, tratados com metformina e isoniazida (INH) este estudo mostrou uma diminuição da carga bacilar nos pulmões em comparação com os ratos tratados apenas com INH. Além disso, o tratamento com met demonstrou uma redução na expressão de genes associados as citocinas pró inflamatórias como IL-1b, TNF, IL-6, MCP-1, CXCL5 e CXCL10 nos pulmões dos ratos e promoveu a expansão de linfócitos T CD8+ específicos para o Mtb, secretando INF-g em ratos não infectados indicando que a met tem um impacto nas células imunes do pulmão independentemente de existir uma infecção em curso. A análise retrospectiva mostrou que os pacientes

tuberculosos diabéticos que usavam met tiveram uma mortalidade menor (3%) em comparação com os que utilizavam outro fármaco (10%)<sup>11</sup>.

Conhecendo previamente as funções celulares da metformina nosso estudo avaliou no primeiro, segundo, sexto e no 18º mês, ou seja 1 ano após o final da terapia, a ação da met na inflamação durante o tratamento da TB. No 18º mês e no primeiro momento é possível perceber que ambos os grupos tiveram níveis semelhantes das citocinas, demonstrando que antes e após o tratamento da TB as características de uma doença crônica como a DM possui uma maior influência na inflamação do que o fármaco utilizado. Nos tempos 2 e 6 nota-se uma maior diferença entre os biomarcadores, principalmente a IL-17F no segundo mês e a IL-5 no sexto mês.

A IL-17F faz parte da família IL-17, que contém sete membros (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ou IL-25, IL-17F, e o homólogo viral vIL-17 ou ORF13)<sup>16</sup>. A IL-17 é produzida principalmente por células Th CD4+ ativadas e é considerada um potente indutor de expressão de quimiocinas, substâncias capazes de causar a migração de leucócitos do sangue para o local da inflamação. Ela estimula a secreção de IL-6, IL-8, GM-CSF e PGE2 pelos fibroblastos humanos e aumenta a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)<sup>17,18</sup>.

IL-17A e IL-17F compartilham um alto grau de homologia entre seus aminoácidos adotando uma estrutura semelhante e possuindo papéis semelhantes na resposta imune contra o Mtb infecção<sup>19,20</sup>.

Estudos já comprovaram que a IL-17A atua na proteção contra infecção por micobactérias no hospedeiro e a supressão na produção de IL-17A aumentou a suscetibilidade à TB<sup>21</sup>. A IL-17A está envolvida na formação e estabilidade de granulomas, aumentando a produção de quimiocinas, o que ajuda a recrutar células inflamatórias que migram para os locais infectados por Mtb<sup>20,22-23</sup>.

O papel imune protetor da IL-17F na infecção por Mtb é semelhante à IL-17A. Este estudo mostrou que a IL-17F possui uma diminuição no grupo Met significativo no segundo mês de tratamento, o que não ocorre com a IL-17A, devido a sua ação semelhante era esperado encontrar uma convergência nos níveis das duas citocinas, mas durante toda a coorte os níveis de ambas as citocinas encontram-se em direções opostas nos dois grupos analisados. Essa relação deverá ser melhor estudada futuramente, pois Ursini et al demonstrou que a metformina gera uma redução de IL-17, porém nesse estudo a citocina IL-17 não foi dividida nos seus subgrupos o que dificulta uma análise mais apurada, visto que a família da IL-17 é composta por 7 membros. Além da diminuição dessa citocina em especial, Ursini relata que a metformina acarreta uma diminuição da infiltração e expressão de outras citocinas inflamatórias como IFN-g, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. As células T isoladas de camundongos tratados com metformina mostraram expressão reduzida de IFN-g e IL-17<sup>24</sup>.

Apesar de Ursini et al<sup>24</sup> ter demonstrado que a metformina gera uma diminuição de IFN-g, nesse estudo não foi considerado a coinfeção entre TB e DM, no nosso estudo, IFN-g está aumentada no segundo mês de tratamento para TB, apesar de não ter tido significância estatística. Segundo Novita et al<sup>25</sup>, esse aumento é considerado positivo, pois a elevação do IFN-g é um dos indicadores de sucesso no tratamento da infecção por TB devido a macrófagos e ativação de Th-1 na indução do processo de autofagia. O uso de met gerou um aumento nas citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, agindo na resposta imunoreguladora de Th-1 e Th-2, especialmente para aumentar o IFN-g e reduzir a IL-10 que atua na inibição das citocinas pró-inflamatórias por Th-1<sup>25</sup>. Assim, nossa análise reproduziu os dados encontrado por Novita, ocorrendo o aumento de IFN-g no segundo mês e diminuição da IL-10 no grupo Met. Importante perceber que após essa fase inicial do tratamento ocorre a diminuição de IFN-g e aumento de IL-10.

Outra citocina estatisticamente significativa foi a IL-5, que é produzida principalmente por linfócitos T. A IL-5 é um fator específico de crescimento e diferenciação dos eosinófilos e basófilos. Atua também no recrutamento de células B aumentando a produção de imunoglobulina<sup>18,26,27</sup>. As informações sobre o papel da IL-5 na TB são limitadas, no entanto, Jerb et al<sup>28</sup> mostrou que apesar da resposta Th1 ser predominante na infecção pelo Mtb, camundongos com deficiência de IL-5 infectados com *Mycobacterium bovis* apresentaram atraso na depuração de micobactérias. Isso se deve provavelmente a ação deficitária dos eosinófilos que envolvem e eliminam micobactérias<sup>28</sup>.

A IL-5 provavelmente desempenha um papel essencial na co-infecção TB e HIV. Diedrich et al<sup>29</sup> relatou que a IL-5 e possivelmente a IL-13, diante da infecção dos monócitos de macacos pelo Vírus da imunodeficiência símia (SIV), atuam inibindo a produção de IFN-g e TNF por células T específicas para Mtb. Além disso, a IL-5 foi considerada uma citocina potente na distinção entre TB ativa e latente, com boa acurácia laboratorial. Suzukawa et al mostrou que os níveis de várias citocinas, isto é, IL-2, -5, -10 e -15, foram maiores nos pacientes com TB latente em comparação com pacientes com TB ativa, uma tendência oposta às outras citocinas<sup>30</sup>.

Kumar et al<sup>30</sup> expressou em seu estudo que pacientes diabéticos e tuberculosos tinham níveis de citocinas regulatórias, como IL-5 e IL-10, maiores do que os não diabéticos<sup>29</sup>. Em outro estudo, esse mesmo autor, relaciona as citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF-b a uma maior participação na resolução da inflamação pulmonar relacionada com infecção pelo Mtb<sup>32</sup>.

Não foi encontrado, até o momento nenhum artigo que realizasse uma correlação entre a IL-5 e a metformina, mas Cameron et al afirma que a metformina leva a uma regulação positiva de IL-2 e IL-4, sabendo que a IL-4, assim como a IL-5, atua na resposta Th2, podemos inferir que o aumento da

IL-5 no grupo Met pode trazer um benefício no combate a Mtb nesse grupo, participando na resolução da infecção<sup>33</sup>.

Observou-se uma diferença na IL-1b entre os dois grupos no 6º mês, embora não tenha atingido significância estatística. O grupo não Met mantém praticamente o mesmo nível de IL-1b no 2º e no 6º mês, já o grupo Met possui um declínio dessa citocina no tempo 6 demonstrando assim uma melhora na inflamação. A IL-1b mantém a inflamação pela estimulação de células CD4+, proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos/macrófagos, aumentando assim atividades quimiotáticas e fagocitárias<sup>18</sup>.

Kumar et al<sup>31</sup>, também demonstrou que pacientes com TB e DM possuíam maiores níveis de citocinas pro-inflamatórias como IL-1b, IL-6 e IL-18 comparado aos pacientes tuberculosos sem diabetes. Assim, é positivo perceber que em nosso estudo a metformina pode ter interferido na diminuição dos níveis de IL-1b, pois a partir desse dado podemos sugerir que a met atua inibindo esse estado inflamatório e controlando melhor a glicose sanguínea, já que a IL-1b age indiretamente aumentando a glicemia<sup>31</sup>.

Nossa análise de correlação mostrou que os pacientes em uso de metformina possuem um número maior de correlações significantes positivas no primeiro momento e no segundo mês. Dessa forma, a metformina pode ter influenciado o combate a infecção proporcionando aumento das citocinas pró inflamatórias durante o curso inicial da infecção. Já no sexto mês e um ano após o tratamento os pacientes TBDM Met apresentam mais associações negativas. Nota-se principalmente a influência da IL-10, mediador chave anti-inflamatório, no sexto mês, onde é possível notar uma associação forte e positiva com a IL-13, citocina que assim como a IL-10 possui ação na redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Esse aumento, no entanto, ocorreu em ambos os grupos, a diferença é que o grupo Met possui mais associações negativas tanto com IL-10 como com a IL-13 (IL-4, IL-12, IL-17A, GM-CSF, G-CSF, e IL-8) diferente do grupo NMet onde ambas as citocinas apresentaram associação negativa apenas com IL-12 e IFN $\gamma$ , indicando assim, uma maior ação anti-inflamatória após o tratamento para TB no grupo Met.

Nosso estudo teve limitações. Durante a coleta dos dados não foi indicado a dose de metformina que cada paciente utilizou. Além disso, na amostra não houve registro sobre quais foram outros fármacos utilizados para o tratamento da diabetes. O número da nossa amostra pode ter influenciado nos resultados obtidos, dessa forma sugerimos que sejam feitos novos trabalhos com um maior número de participantes para ratificar os resultados encontrados em outros estudos.

Em conclusão, nossos resultados indicaram que os indivíduos com TBDM Met apresentaram uma melhor resposta a infecção pelo Mtb, produzindo citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatória a depender do momento específico no tratamento, indicando assim que o uso da metformina pode ter gerado um menor estado inflamatório após o tratamento para tuberculose.

#### **AGRADECIMENTOS**

Os autores gostariam de agradecer a (equipe da iniciativa MONSTER) pelo suporte técnico na análise e discussão do estudo; Dr Carla Daltro, por sua ajuda durante a finalização da escrita do trabalho.

**REFERÊNCIAS**

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2017. 20th edition Geneva, Switzerland: WHO; 2017.
2. Seiscento M. Tuberculose em Situações Especiais: HIV, Diabetes Mellitus e Insuficiência Renal. Pulmão RJ, 2012.
3. Sales WB, Silva MR, Amaral AR, Ferreira BS, Silva JC, Bertini AMA. Eficácia da metformina no tratamento do diabetes mellitus gestacional. *Rev. Bras. Pesq. Saúde*, 2016, v. 17 n. 3.
4. Reis-Santos B, Locatelli R, Horta BL, Faerstein E, Sanchez MN, Riley LW, et al. Socio-Demographic and Clinical Differences in Subjects with Tuberculosis with and without Diabetes Mellitus in Brazil – A Multivariate Analysis. *Plos One*, 2013, Apr 24;8(4): e62604.
5. Baghaei P, Marjani M, Javanmard P, Tabarsi P, Masjedi MR. Diabetes mellitus and tuberculosis facts and controversies. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 2013, Dec 20;12(1):58.
6. Baker MA, Harries AD, Jeon CY, Hart JE, Kapur A, Lönnroth K, et al. The impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review. *BMC Med* 2011, Jul 1;9:81.
7. Viswanathan V, Vigneswari A, Selvan K, Satyavani K, Rajeswari R, Kapur A. Effects of diabetes on treatment outcome of smear-positive pulmonary tuberculosis: a report from South India. *J Diabetes Complications*, 2014 Mar-Apr;28(2):162-5.
8. Jimenez-Corona ME, Cruz-Hervert LP, Garcia-Garcia L, Ferreyra-Reyes L, Delgado-Sánchez G, Bobadilla-Del-Valle M, et al. Association of diabetes and tuberculosis: impact on treatment and post-treatment outcomes. *Thorax* 2013, Mar;68(3):214-20.
9. Jonnalagada S, Harries AD, Zachariah R, Satyanarayana S, Tetali S, Chander GK, et al. The timing of death in patients with tuberculosis who die during anti-tuberculosis treatment in Andhra Pradesh, South India. *BMC Public Health* 2011, december 921.
10. Marupuru S, Senapatia P, Pathadkaa S, Miraja SS, Unnikrishnana MK, Manub MK. Protective effect of metformin against tuberculosis infections in diabetic patients: an observational study of south Indian tertiary healthcare facility. *Braz J Infect Dis*. 2017, vol.21 no.3.
11. Singhal A. Metformin as adjunct antituberculosis therapy. *Science Translational Medicine* 6, 2014.
12. Martinez N, Kornfeld H. Diabetes and immunity to tuberculosis. *Eur J Immunol*, 2014.
13. Lynch DH, Miller RE. Interleukin 7 promotes long-term in vitro growth of antitumor cytotoxic T lymphocytes with immunotherapeutic efficacy in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 1994.
14. Padmapriyadarsini C, Bhavani PK, Natrajan M, Ponnuraja C, Kumar H, Gomathy SN, et al. Evaluation of metformin in combination with rifampicin containing antituberculosis therapy in patients

with new, smear-positive pulmonary tuberculosis (METRIF): study protocol for a randomised clinical trial. *BMJ Open*, 2019, Volume 9, Issue 3.

15. Lachmandas E, Eckold C, Böhme J, Koeken VACM, Marzuki MB, Blok B, et al. Metformin Alters Human Host Responses to *Mycobacterium tuberculosis* in Healthy Subjects. *The of Infectious Diseases*, 2019 Jul 1; 220(1): 139–150.

16. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *Journal Exp Med*, 2001 Aug 20;194(4):519-27.

17. Moutinho ILD. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. *Rev Med Minas Gerais*, 2011.

18. Varella PPV, Forte WCN. Citocinas: revisão. *Ver bras. alerg. imunopatol*, 2011.

19. Wright JF, Bennett F, Li B, Brooks J, Luxenberg DP, Whitters MJ, et al. The Human IL-17F/IL-17A Heterodimeric Cytokine Signals through the IL-17RA/IL-17RC Receptor Complex. *The Journal of Immunology*, 2008 Aug 15;181(4):2799-805.

20. Shen H, Chen ZW. The crucial roles of Th17-related cytokines/signal pathways in *M. tuberculosis* infection. *Cellular and Molecular Immunology*, 2018.

21. Gopal R, Lin Y, Obermajer N, Slight S, Nuthalapati N, Ahmed M, et al. Interleukin-23 dependent IL-17 drives Th1 responses following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Eur J Immunol*, 2012.

22. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, et al. IL-17-Mediated Regulation of Innate and Acquired Immune Response against Pulmonary *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin Infection. *The Journal of Immunology*, 2019.

23. Yoshida YO, et al. Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung. *The Journal of Immunology*, 2010 Mar 15;178(6):3786-96.

24. Ursini F, Russo E, Pellino G, D'Angelo S, Chiaravalloti A, De Sarro G, Manfredini R, et al. Metformin and Autoimmunity: A “New Deal” of an Old Drug. *Frontiers in Immunology*, 2018 Jun 4;9:1236.

25. Novita BD, Soediono EI, Nugraha J. Metformin associated inflammation levels regulation in type 2 diabetes mellitus-tuberculosis coinfection patients – A case report. *Indian Journal of Tuberculosis*, 2018 Oct;65(4):345-349.

26. Tadimitsu K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *The Japan Academy*, 2011.

27. Domingo-Gonzalez R, Prince O, Cooper A, Khader SA. Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbiol Spectr*, 2016 Oct;4(5).

28. Jerb K, Kirman J, Delahunt B, Chen W, Gros GL. IL-4, IL-5 and IL-10 are not required for the control of *M. bovis*-BCG infection in mice. *Immunology and Cell Biology*, 1998, 76, 41–46.

29. Diedrich CR, Flynn JL. HIV-1/mycobacterium tuberculosis coinfection immunology: how does HIV-1 exacerbate tuberculosis? *Infection and Immunity*, 2011 April, P. 1407–1417 Vol. 79, No. 4.
30. Suzukawa M, Akashi S, Nagai H, Nagase H, Nakamura H, Matsui H, et al. Combined Analysis of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-5, IL-10, IL-1RA and MCP-1 in QFT Supernatant Is Useful for Distinguishing Active Tuberculosis from Latent Infection. *PLOS ONE*, 2016 April 1.
31. Kumar NP, Sridhar R, Banurekha VV, Jawahar MS, Fay MP, Nutman TB, et al. Type 2 Diabetes Mellitus Coincident with Pulmonary Tuberculosis Is Associated with Heightened Systemic Type 1, Type 17, and Other Proinflammatory Cytokines. *Annals American Thoracic Society*, 2013 Oct;10(5):441-9.
32. Kumar NP, Fukutani KF, Shruthi BS, Alves T, Silveira-Mattos PS, Rocha MS, et al. Persistent inflammation during antituberculosis treatment with diabetes comorbidity. *eLife*, 2019 Jul 4;8. pii: e46477.
33. Cameron AR, Morrison VL, Levin D, Mohan M, Forteach C, Beall C, et al. Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status. *Circulation Research*, 2016 Aug 19; 119(5): 652–665.