

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Anna Carolina Paganini Guañabens

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMBIENTES OXIDANTES INTRACELULARES NO
PERFIL DE MULTIPLICAÇÃO INTRACELULAR DE *T. CRUZI*: meta-análise**

Belo Horizonte

2021

Anna Carolina Paganini Guañabens

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMBIENTES OXIDANTES INTRACELULARES NO
PERFIL DE MULTIPLICAÇÃO INTRACELULAR DE *T. CRUZI*: meta-análise**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana O. Andrade
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2021

- 043 Guañabens, Anna Carolina Paganini.
Avaliação do papel de ambientes oxidantes intracelulares no perfil de multiplicação intracelular de *T. Cruzi*: meta-análise [manuscrito] / Anna Carolina Paganini Guañabens. – 2021.
107 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Luciana O. Andrade.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.
1. Biología Celular. 2. Doença de Chagas. 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Espaço Intracelular. 5. Espécies de Oxigênio Reativas. I. Andrade, Luciana de Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576





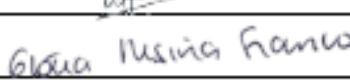
ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
ANNA CAROLINA PAGANINI GUAÑABENS

340/2021
entrada
2º/2018
2018720273

Às **quatorze horas** do dia **26 de fevereiro de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AMBIENTES OXIDANTES INTRACELULARES NO PERFIL DE MULTIPLICAÇÃO INTRACELULAR DE *T. CRUZI*: META-ANÁLISE**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Luciana de Oliveira Andrade**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Luciana de Oliveira Andrade	UFMG	Aprovada
Dra. Walderez Ornelas Dutra	UFMG	Aprovada
Dra. Glória Regina Franco	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2021.**

Dr^a. Luciana de Oliveira Andrade (Orientadora) 
Dr^a. Walderez Ornelas Dutra 
Dr^a. Glória Regina Franco 

Fernanda RCL Almeida

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

À Mirian Paganini Guañabens e Fernando Cesar Moura Guañabens, meus queridos pais, pelo amor e confiança incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Aos pesquisadores,

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Luciana Andrade, por suas contribuições científicas relevantes e por sua paciência nesse momento difícil de pandemia que me permitiram evoluir em meu processo de amadurecimento científico e concluir essa dissertação.

Aos meus colegas do laboratório, Raí, Jorge, Anny, Luísa, Ana Elisa, Natália; Sérgio, Heliana, Bruno, que dividiram comigo o cotidiano do fazer científico.

Aos professores e alunos do Laboratório Genética Bioquímica, que sempre contribuíram com parcerias intelectuais e materiais amenizando as dificuldades atravessadas.

A todos aqueles que fizeram parte desse trabalho com sugestões iniciais, Dr. Júlio Brito (FUNED), Me. João Locke, Dr.^a Virgínia.

Ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e a todos que contribuíram com esse trabalho direta ou indiretamente.

Às agências de fomento à pesquisa: CAPES, CNPq, FAPEMIG pelos subsídios financeiros individuais e coletivos que viabilizaram a condução desse estudo.

À minha família,

A meus pais, Mirian e Fernando, que sempre acreditaram em meu potencial e tiveram como o estudo uma prioridade, que não me deixaram desistir e que estiveram comigo em todos os momentos.

Ao meu tio Luiz, que compartilha comigo as angústias e as alegrias da vida acadêmica, me ajudando sempre com bons conselhos.

À Paula e à tia Marieta, que nesse período de pandemia têm nos ajudado muito e com quem também compartilhei momentos do mestrado e da licenciatura.

In memoriam:

À Amélia Pirilo Paganini, minha querida avó, a quem o saber sempre foi essencial, que sempre batalhou pelo estudo dos filhos, com quem sempre tive cumplicidade e um carinho enorme. À minha tia Nilze que me ajudou em momentos de grande dificuldade, compartilhou comigo suas vivências acadêmicas. À tia Inês, mulher independente e forte que me auxiliou com questões práticas e dividiu comigo momentos divertidíssimos.

RESUMO

A doença de Chagas é uma enfermidade negligenciada, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Esse organismo infecta hospedeiros invertebrados e vertebrados, enfrentando vários desafios para sua sobrevivência. Em mamíferos, a infecção leva a respostas oxidantes pelas células, por meio da geração de espécies reativas do oxigênio (ROS). A literatura científica revela que os efeitos dessas substâncias podem ser tanto deletérios, quanto benéficos, levando à morte celular ou promovendo a multiplicação parasitária. As razões para essas diferenças não são bem compreendidas, mas dados mostram que cepas pertencentes a diferentes unidades discretas de tipificação (DTUs), respondem de modos variados a esses estímulos. Buscou-se obter informações acerca da influência de ambientes intracelulares, oxidantes ou redutores, sobre a taxa de divisão celular de amastigotas de *T. cruzi* pertencentes às DTUs I e II por meio do agrupamento de estudos em uma revisão sistemática, com meta-análise. A pesquisa foi feita nas bases de dados PubMed e Embase, no dia 06 de setembro de 2020, sem preferência de linguagem, excluindo-se estudos de natureza secundária e da “literatura cinza” (revisões, editoriais, resumos de congresso, teses e dissertações). A estratégia de busca foi elaborada a partir da determinação da população (*Trypanosoma cruzi*) e da intervenção (ROS) com o uso de vocabulário controlado de cada uma das bases de dados (Mesh, Emtree), título e resumo, termos livres. Obteve-se 1109 estudos, dos quais se removeu as duplicatas e se avaliou com base em título, título e resumo, metodologia, seguindo critérios de inclusão e exclusão pré-definidos. Ao final, oito artigos de uma lista de elegíveis foram selecionados, por meio de uma ferramenta *online* de geração de números aleatórios, para a eliminação de possíveis vieses durante o processo de seleção. As referências incluídas foram heterogêneas, englobando dados de várias cepas parasitárias, linhagens celulares, animais e técnicas, que se refletiu nos dados estatísticos, como o teste do I^2 . Após a meta-análise, não foi possível identificar um perfil DTU-específico de proliferação intracelular. Além da heterogeneidade, destaca-se a existência de poucos trabalhos avaliando o efeito do estresse oxidativo sobre a proliferação de *T. cruzi*, indicando a necessidade de mais investigações experimentais nessa área.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Ambiente Intracelular. Multiplicação de Amastigotas. Modelos Laboratoriais. Síntese da Evidência Científica.

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected malady caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. This organism infects invertebrate and vertebrate hosts, in which it faces several challenges for survival and proliferation. In mammals, the infection leads to cell oxidative responses generating reactive oxygen species (ROS). Scientific literature demonstrates that the effects of ROS can be both harmful and beneficial to *T. cruzi*, leading to cell death mechanisms or promoting its multiplication. The reasons for those differences are not well understood, but data show that strains belonging to different discrete typing units (DTUs) respond differently to these stimuli. Thus, we sought, by grouping studies in a systematic review with meta-analysis, to obtain information about the influence of oxidizing or reducing intracellular environments on the rate of *T. cruzi* amastigote replication, focusing on strains belonging to DTUs I and II. The research was conducted in PubMed and Embase, in September 6th, 2020, without language restrictions and not including secondary or 'grey literature' (reviews, editorials, congress abstracts, thesis, dissertations). The search strategy was built determining population (*Trypanosoma cruzi*) and intervention (ROS) with controlled vocabulary (MeSH, Emtree), title, title and abstract and free terms. 1109 references were recovered. They were screened to remove duplicates and by analysis of title, title and abstract, as well as methodology with help of inclusion and exclusion criteria, defined *a priori*. A list with eligible studies was obtained and eight of them were randomly selected by means of an *online* tool for generation of random numbers, to minimize bias in the selection process. The papers included in the meta-analysis were heterogeneous, gathering data from several parasite strains, techniques for assessing *T. cruzi* burden, as well as cell and animal lineages, reflected in the statistical data, I^2 -test of heterogeneity. After the meta-analysis was performed, it was not possible to identify a DTU-specific profile for intracellular multiplication. Besides the heterogeneity in the papers, we highlight the existence of very few studies evaluating the effect of oxidative stress on the intracellular proliferation, indicating the need for further experimental investigation in this area.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. Intracellular Environment. Amastigote Multiplication. Laboratory Models. Synthesis of Scientific Evidence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida clássico de <i>T. cruzi</i>	22
Figura 2: Exemplo de uma casa de pau-a-pique e a numerosa família que lá vivia..	23
Figura 3: Fases e formas da doença de Chagas.....	24
Figura 4: Distribuição de imigrantes acometidos com infecções pelo <i>T. cruzi</i> na América do Norte, Europa, Ásia e Oceania.....	26
Figura 5: Modelos evolutivos de origem dos grupos de <i>T. cruzi</i>	27
Figura 6: Ciclos domésticos e silvestres de <i>T. cruzi</i> na América Latina e Estados Unidos.....	28
Figura 7: Classificação das espécies reativas do oxigênio e exemplos de moléculas em cada categoria.....	29
Figura 8: Permeabilidade de espécies reativas às membranas lipídicas.....	31
Figura 9: Hierarquia dos níveis de evidência científica.....	36
Figura 10: Exemplo de descrição da Exclusão e Inclusão por Palavras-chave/Tema.....	48
Figura 11: Modos de calibração de eixos de gráficos no WebPlotDigitizer.....	49
Figura 12: Diagrama do processo de seleção dos estudos.....	55
Figura 13: Técnicas moleculares em ambientes normal e antioxidante.....	62
Figura 14: Técnicas citológicas em ambientes normal e antioxidante.....	63
Figura 15: Técnicas histológicas teciduais em ambientes normal e antioxidantes....	65
Figura 16: Técnicas histológicas em ambiente intracelular normal vs. oxidante.....	67
Figura 17: Meta-análise com Modelo de Efeitos Aleatórios: dados globais, agrupamento das diferentes técnicas. Ambiente antioxidante vs. normal.....	68
Figura 18: Análise de subgrupos: remoção das técnicas moleculares. Modelo de Efeitos Aleatórios. Ambiente antioxidante vs. normal.....	70
Figura 19: Análise de subgrupos por técnicas: remoção das técnicas histológicas. Modelo de Efeitos Aleatórios. Ambiente antioxidante vs. normal.....	71
Figura 20: Análise de subgrupos: remoção das técnicas citológicas. Modelo de Efeitos Aleatórios. Ambiente antioxidante vs. normal.....	72
Figura 21: Meta-análise com Modelo de Fixos: dados globais, agrupamento das diferentes técnicas. Ambiente antioxidante vs. normal.....	73
Figura 22: Análise de subgrupos: remoção de técnicas moleculares. Modelo de Fixos. Ambiente antioxidante vs. normal.....	74

Figura 23: Análise de subgrupos: remoção de técnicas histológicas. Modelo de Fixos. Ambiente antioxidante vs. normal.	75
Figura 24: Análise de subgrupos: remoção de técnicas citológicas. Modelo de Fixos. Ambiente antioxidante vs. normal.	76
Quadro 1: Interpretação das diferenças de médias padronizadas (SMD) com base em escala pré-definida.....	53
Quadro 2: Características dos animais de onde os tecidos ou células foram amostrados.....	56
Quadro 3: Perfil das cepas utilizadas.....	57
Quadro 4: Características das células e de <i>T. cruzi</i> utilizados na meta-análise.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela A: Meta-análise de técnicas moleculares em ambientes normal e antioxidante	90
Tabela B: Análise de sensibilidade por remoção de Dhiman & Garg (2011), técnicas moleculares	90
Tabela C: Análise de sensibilidade por remoção de Dhiman & Garg (2014), técnicas moleculares	91
Tabela D: Análise de sensibilidade por remoção de Barroso <i>et al.</i> (2016), técnicas moleculares	91
Tabela E: Análise de sensibilidade por remoção de Vilar-Pereira <i>et al.</i> (2016), técnicas moleculares	91
Tabela F: Meta-análise de técnicas citológicas em ambientes normal e antioxidante	92
Tabela G: Análise de sensibilidade por remoção de Paiva <i>et al.</i> (2012), técnicas citológicas.....	92
Tabela H: Análise de sensibilidade por remoção de Goes <i>et al.</i> (2016), técnicas citológicas.....	92
Tabela I: Análise de sensibilidade por remoção de Barroso <i>et al.</i> (2016), técnicas citológicas.....	93
Tabela J: Meta-análise de focos parasitários teciduais em ambientes normal e antioxidantes	93
Tabela K: Análise de sensibilidade por remoção de Paiva <i>et al.</i> (2012), técnicas histológicas.....	93
Tabela L: Análise de sensibilidade por remoção de Gutierrez <i>et al.</i> (2014), técnicas histológicas.....	94
Tabela M: Análise de sensibilidade por remoção de Dhiman & Garg (2014), técnicas histológicas.....	94
Tabela N: Análise de sensibilidade por remoção de Contreras-Ortiz <i>et al.</i> , (2017), técnicas histológicas	94
Tabela O: Meta-análise de focos parasitários teciduais em ambiente intracelular normal vs. oxidante	94
Tabela P: Análise de sensibilidade por remoção de Paiva <i>et al.</i> (2012), técnicas histológicas (normal vs. oxidante)	95

Tabela Q: Análise de sensibilidade por remoção de Gutierrez <i>et al.</i> (2014), técnicas histológicas (normal vs. oxidante)	95
Tabela R: Análise de sensibilidade por remoção de Contreras-Ortiz <i>et al.</i> (2017), técnicas histológicas (normal vs. oxidante)	95
Tabela S: Meta-análise com Modelo de Efeitos Aleatórios: dados globais, agrupamento das diferentes técnicas.....	96
Tabela T: Análise de subgrupos, técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Aleatórios. Remoção de técnicas moleculares.....	97
Tabela U: Análise de subgrupos, técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Aleatórios. Remoção de técnicas histológicas	98
Tabela V: Análise de subgrupos, técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Aleatórios. Remoção de técnicas citológicas	99
Tabela W: Meta-análise com Modelo de Fixos: dados globais, agrupamento das diferentes técnicas	100
Tabela X: Análise de subgrupos, técnicas agrupadas (Modelo de Efeitos Fixos). Remoção de técnicas moleculares.....	101
Tabela Y: Análise de subgrupos, técnicas agrupadas (Modelo de Efeitos Fixos). Remoção de técnicas histológicas	102
Tabela Z: Análise de subgrupos, técnicas agrupadas (Modelo de Efeitos Fixos). Remoção de técnicas citológicas	103

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

μ M: micromolar

-/-: *knockout*

AhR: receptor de hidrocarbonetos de arílicos (*aryl hydrocarbon receptor*)

BALB/c: linhagem de camundongo consanguíneo albino, *Bagg's albino*

C3H/He: sub-linhagem de camundongos consanguíneos resultado do cruzamento entre BALB com DBA, de cor agouti

C57BL/6: linhagem de camundongo consanguíneo de cor preta

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Cyp: ciclofilina

Df: graus de liberdade (*degrees of freedom*)

DNA: ácido desoxirribonucleico

Dpi: dias pós-infecção

DTU: unidades discretas de tipificação (*discrete typing units*)

Embase: *Excerpta Medica Database*

FeTTPS: *5,10,15,20-tetrakis(4-sulphonatophenyl) porphyrinato iron (III)*

GPLs: glicopeptídiolipídios específicos associados à superfície

HA: hemaglutinina

Hpi: horas pós-infecção

IP: intraperitoneal

iPCs: células tronco pluripotentes induzidas

kg: quilograma

KO: *knockout*

MEC: Ministério da Educação

MEFs: fibroblastos embrionários murinos

mg: miligrama

MG: Minas Gerais

mM: milimolar

MOI: multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection*)

MPTs: poros mitocondriais de permeabilidade transitórios

Mt: mitocondrial

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

ND:

não

determinado

NOX2: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH) oxidase 2

PCR: reação em cadeia da enzima polimerase

PEG: polietilenoglicol

pH: potencial hidrogeniônico

Phox: oxidase fagocítica (*phagocitic oxidase*)

PICO: população, intervenção, comparador/controle, desfecho

qPCR: reação em cadeia da enzima polimerase semiquantitativa

RevMan: Review Manager

RNA: ácido ribonucleico

ROS: espécies reativas do oxigênio

RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SD: desvio-padrão (*standard deviation*)

SEM: erro-padrão da média (*standard error of the mean*)

SMD: diferença de médias padronizadas (*standardized mean difference*)

SYRCLE: *Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation*

Tc: *Trypanosoma cruzi*

Tc18S: gene que codifica para a subunidade ribossômica de *T. cruzi*

TcCyp: ciclofilina de *T. cruzi*

TCT: tripomastigotas de cultura

Tripos: tripomastigotas

WT: tipo selvagem (*wild type*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> e a doença de Chagas	21
2.2	Epidemiologia	25
2.3	Classificação taxonômica e filogenia de <i>T. cruzi</i>	26
2.4	Espécies reativas do oxigênio (ROS)	29
2.5	Ações das espécies reativas do oxigênio (ROS) nos seres vivos	31
3	INTRODUÇÃO ÀS REVISÕES DA LITERATURA COM BASE EM MEDICINA BASEADA EM EVIDÊNCIAS	35
3.1	Revisões bibliográficas: várias abordagens e técnicas.....	35
3.2	Críticas epistemológicas à hierarquização e à “medicina baseada em evidências”	37
4	JUSTIFICATIVA	37
5	INTRODUÇÃO AOS MÉTODOS ESTATÍSTICOS DAS REVISÕES SISTEMÁTICAS COM META-ANÁLISES	39
5.1	Revisões sistemáticas e meta-análises: modelos e métodos	39
5.2	Modelo de Efeitos Aleatórios ou Randômicos e Modelo de Efeitos Fixos 40	
5.3	Método do Inverso da Variância.....	42
5.4	Testes de heterogeneidade	42
6	PERGUNTA DE PESQUISA	43
6.1	Objetivo geral.....	43
6.1.1	<i>Objetivos Específicos</i>	43
6.2	Hipóteses	44
7	MATERIAIS E MÉTODOS	44
7.1	Base de dados e estratégia de busca	44
7.1.1	<i>Estratégias de busca</i>	44

7.2	Gerenciamento das referências obtidas.....	46
7.3	Crítérios para a inclusão ou exclusão das referências no estudo	46
7.3.1	<i>Crítérios de exclusão</i>	46
7.3.2	<i>Crítérios de inclusão</i>	47
7.4	Triagem dos estudos.....	47
7.4.1	<i>Triagem inicial</i>	47
7.4.2	<i>Triagem secundária e terciária</i>	48
7.4.3	<i>Obtenção de textos completos e incompletos</i>	48
7.4.4	<i>Extração de dados dos gráficos dos artigos científicos</i>	49
7.5	Meta-análise: medidas e modelos.....	50
7.5.1	<i>Medidas de sumarização.....</i>	51
7.6	Gráficos de floresta (<i>forest plots</i>)	53
8	RESULTADOS	54
8.1	Seleção dos estudos recuperados.....	54
8.2	Características dos estudos	55
8.2.1	<i>Ambiente intracelular: normal versus antioxidante</i>	61
8.2.2	<i>Focos parasitários teciduais</i>	64
8.2.3	<i>Ambiente intracelular: normal versus oxidante</i>	66
8.2.4	<i>Meta-análise de técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Aleatórios.....</i>	68
8.3	Análise de subgrupos por técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Aleatórios.....	69
8.3.1	<i>Meta-análise de técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Fixos</i>	73
9	DISCUSSÃO	77
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	81
10.1	Limitações da pesquisa	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
	APÊNDICE A	90
	APÊNDICE B	104

APÊNDICE C	105
-------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença parasitária negligenciada e multifatorial que afeta milhares de pessoas pelo mundo, cujo agente etiológico é o protozoário parasito *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2018). As formas de vida desse organismo são tão complexas quanto a enfermidade que ele provoca, sendo elas: as epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas, além de seus estágios intermediários de diferenciação (CHAGAS, 1909; BRENER, 1965, BRENER, 1969; PRATA, 2001; de SOUZA; BARRIAS, 2020). As epimastigotas e as amastigotas são as formas replicativas, enquanto as tripomastigotas são as formas infectantes (CHAGAS, 1909; de SOUZA; BARRIAS, 2020; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). As formas tripomastigotas podem ser divididas em metacíclicas e sanguíneas, estando presentes nos hospedeiros invertebrado e vertebrado, respectivamente (CHAGAS, 1909; de SOUZA; BARRIAS, 2020; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Durante o processo de colonização de seus hospedeiros, cada uma delas encontra-se exposta a ambientes intra ou extracelulares com características diversas, sendo vários os desafios a serem superados para se perpetuar como espécie. A interação de *T. cruzi* com os ambientes intracelulares influencia o curso da infecção e contribui para desfechos futuros favoráveis ou não em casos em humanos. Dentre os diversos fatores que podem influenciar a colonização celular pelo *T. cruzi*, destaca-se aqui a ocorrência do estresse oxidativo e seus níveis de produção.

O estresse oxidativo é mediado pela produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e citocinas inflamatórias e é importante para o controle de agentes infecciosos em seus hospedeiros, minimizando a proliferação e dispersão desses patógenos (MACHADO *et al.* 2012). Por muito tempo, acreditou-se que morte parasitária e inibição da proliferação eram os únicos desfechos prováveis para a exposição de *T. cruzi* a tais substâncias (PIACENZA *et al.* 2007). Entretanto, na última década, cresceram as investigações a respeito do efeito benéfico das espécies reativas do oxigênio para a multiplicação de diferentes tipos celulares, incluindo formas amastigotas de *T. cruzi*. Os níveis de ROS necessários ou responsáveis por esses efeitos benéficos ainda não são conhecidos e, no caso do *T. cruzi*, nem se tem um consenso a respeito da habilidade de cada cepa ou unidade discreta de tipificação (DTUs) reconhecer e reagir ao sinal promovido por ROS.

Esse trabalho visa obter um maior conhecimento nesse campo por meio da revisão sistemática da literatura e meta-análise dos dados, tentando correlacionar os perfis replicativos de amastigotas de diferentes grupos de *T. cruzi* (DTUs I e II) com ambientes mais ou menos oxidativos. Esse tipo de análise permite que se tenha uma maior confiança nos resultados obtidos e uma visão ampliada do problema, já que resulta de agrupamentos com critérios bem definidos.

Essa dissertação foi feita com base em dados de pesquisas básicas, *in vitro* e *in vivo*. Estes são geralmente heterogêneos, mas possibilitam que se avalie diferentes padrões e tendências, tal como aspectos metodológicos importantes, contribuindo, assim, para futuros sucessos em pesquisas de natureza aplicada e/ou clínica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Esse capítulo aborda aspectos básicos sobre o protozoário *Trypanosoma cruzi* e da Doença de Chagas. Dentre eles, aspectos históricos, epidemiológicos, de biologia celular e parasitária, tal como aspectos evolutivos e taxonômicos do parasito. Além disso, são apresentadas as espécies reativas do oxigênio (ROS) e sua relação com o parasito em questão.

2.1 Ciclo de vida de *T. cruzi* e a doença de Chagas

O *T. cruzi* é um protozoário com hábitos de vida parasitários. É capaz de infectar vários grupos dentro do Reino Metazoa, sendo o agente causador da doença de Chagas ou tripanossomíase americana. Destacam-se os artrópodes da ordem dos hemípteros, subfamília Triatominae, que agem como vetores da doença, e diversas ordens e superordens de mamíferos: Didelphimorphia, Xenarthra, Rodentia, Primata, Carnivora, Chiroptera, Artiodactyla, que atuam como reservatórios ou hospedeiros vertebrados para a doença de Chagas (JANSEN, XAVIER, 2017).

O *T. cruzi* apresenta formas estruturalmente distintas com papéis biológicos variados em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados (CHAGAS, 1909; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). O ciclo do parasito e da doença de Chagas acontece quando um triatomíneo, no momento de seu repasto sanguíneo, ingurgita-se de sangue de um vertebrado e defeca sobre o local da ferida (CHAGAS, 1909; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Nas fezes e urina desse inseto, estão presentes formas flageladas do protozoário que são altamente infecciosas, chamadas de tripomastigotas metacíclicas, que se diferenciam a partir de epimastigotas (formas replicativas), principalmente na região do intestino posterior e reto do barbeiro (CHAGAS, 1909). As tripomastigotas metacíclicas penetram na região lesionada da pele ou mucosas quando o hospedeiro vertebrado se coça. Uma vez que isso acontece, esses parasitos podem infectar células no local de penetração ou atingir a corrente sanguínea do animal e vários sistemas orgânicos (figura 1) (CHAGAS, 1909; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Uma vez no interior das células, as tripomastigotas se transformam em amastigotas, que são as

formas replicativas no hospedeiro vertebrado. Após sucessivas divisões no interior celular, essas amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas, agora denominadas sanguíneas, e podem infectar novas células ou cair na circulação e serem ingeridas por novos insetos vetores durante o repasto sanguíneo, fechando o ciclo (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

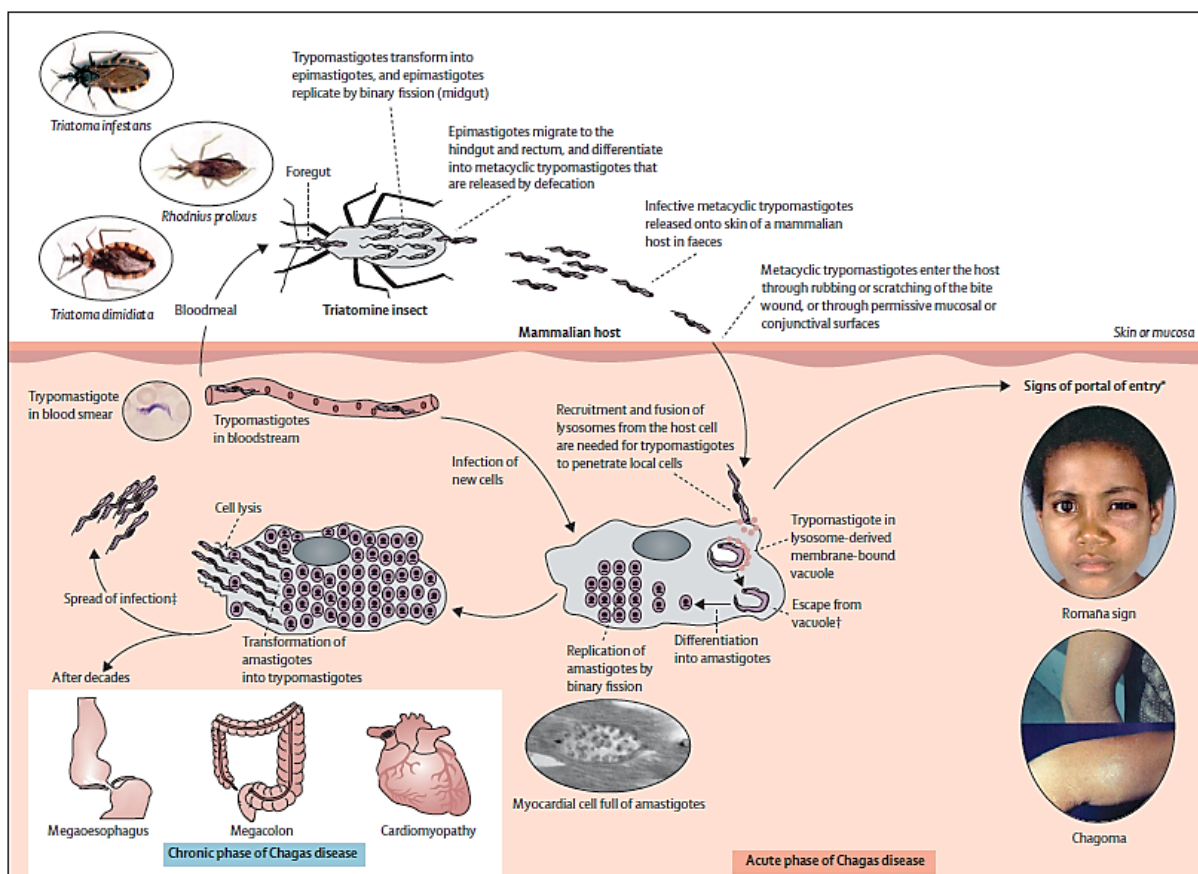


Figura 1: Ciclo de vida clássico de *T. cruzi*.

A figura mostra o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* em seus hospedeiros invertebrado e vertebrado. O ciclo se inicia com a ingestão de tripomastigotas presentes no sangue, de um hospedeiro vertebrado infectado, durante o repasto pelo hospedeiro invertebrado (várias espécies de barbeiros reduviídeos têm esse papel). Uma vez no intestino médio do hospedeiro invertebrado, essas formas se transformam em epimastigotas (formas replicativas), iniciando sua multiplicação nesse hospedeiro. Essas formas então migram para o intestino posterior do barbeiro transformando-se em formas tripomastigotas metacíclicas, infectantes para o hospedeiro vertebrado. Durante o repasto sanguíneo as tripomastigotas metacíclicas são eliminadas junto com as fezes do barbeiro, podendo penetrar no hospedeiro vertebrado pelo local da picada ou diretamente através da mucosa. No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de infectar diversos tipos celulares, transformando-se em amastigotas, as quais são capazes de se multiplicarem no ambiente intracelular. Após várias divisões, as amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas (agora denominadas de tripomastigotas sanguíneas), que são liberadas no ambiente extracelular, podendo infectar novas células ou atingir a corrente sanguínea ou serem ingeridas novamente por um hospedeiro invertebrado, fechando o ciclo. Fonte: Adaptado de Rassi JR.; Rassi & Marin-Neto (2010), p. 1389.

A doença de Chagas é caracterizada por duas fases: a aguda e a crônica. A primeira dura de dois a quatro meses, período em que a parasitemia é detectável e geralmente seus sintomas são brandos (CHAGAS, 1916; DUTRA *et al.*, 2009; LOPEZ *et al.* 2018). Nos casos agudos sintomáticos, menos de 5-10% dos casos evoluem para óbito, sendo ocasionados por miocardites, meningoencefalites ou ambos (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A manifestação aguda da doença pode ser mais grave em indivíduos com menos de cinco anos de vida, idosos, imunossuprimidos ou com alta carga parasitária, como acontece geralmente por meio da infecção oral (WHO, 2015). Chagas (1916) descreveu a forma aguda da moléstia principalmente em crianças, na região de Lassance - MG. Dentre os sintomas, que aparecem de uma a duas semanas após a infecção, destaca-se: os edemas generalizados, manifestações nos sistemas digestivo, cardíaco e nervoso central, os últimos com mau prognóstico (CHAGAS, 1916, RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). As pessoas acometidas pela doença em questão tinham em comum as péssimas condições de moradia (figura 2), as quais favoreciam a proliferação dos triatomíneos transmissores do *T. cruzi*, assim como acesso precário à saúde e nutrição, evidenciando o caráter socioeconômico da enfermidade (CHAGAS, 1909; PRATA, 2001, LACERDA, 2009).



Figura 2: Exemplo de uma casa de pau-a-pique e a numerosa família que lá vivia. Foto mostrando habitação de pau-a-pique, local propício à instalação do hospedeiro invertebrado do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Lacerda (2009), p. 138.

Com o decorrer do tempo, o sistema imunológico é capaz de controlar, com certa eficácia, os níveis parasitários e o acometido entra na fase crônica, a qual pode se desenvolver para a forma indeterminada ou sintomática (figura 3) (DUTRA *et al.*, 2009). Segundo Rassi *et al.* (2017), na forma indeterminada, os indivíduos, embora positivos para o *T. cruzi* quando testados em exames laboratoriais, não apresentam sintomas ou os exibem alterações bastante leves quando é feita uma avaliação médica mais profunda. Devido a isso, são descritos como infectados, porém sem a doença de Chagas, já que não exibem patologia correspondente a ela e apresentam bom prognóstico de vida (RASSI *et al.* 2017). É importante destacar que os pacientes com a forma crônica indeterminada podem evoluir para a forma sintomática (RASSI *et al.* 2017). Entretanto, os mecanismos dessa mudança de perfil patogênico não são completamente conhecidos (RASSI *et al.* 2017).

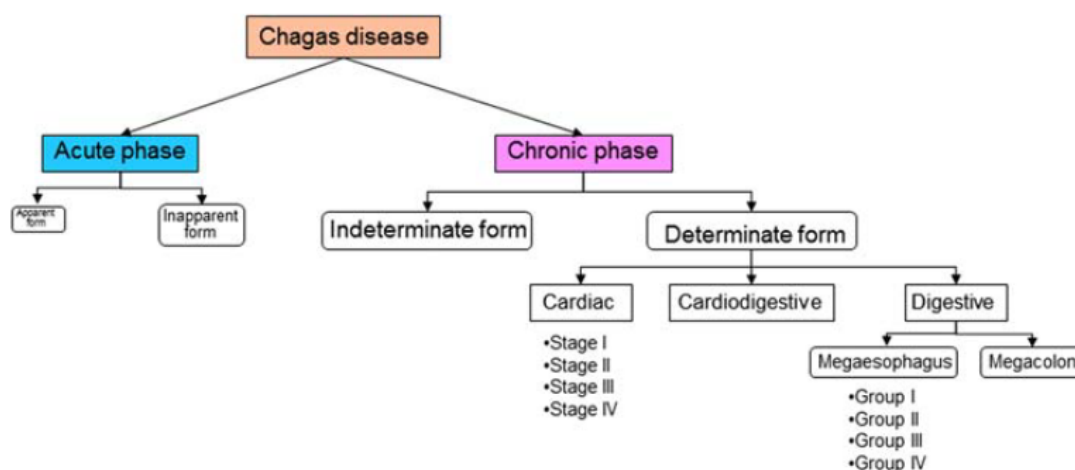


Figura 3: Fases e formas da doença de Chagas

Fluxograma indicando as diferentes fases da infecção do hospedeiro humano pelo *Trypanosoma cruzi*, bem como as diferentes formas clínicas apresentadas pelos pacientes infectados. Fonte: Rassi *et al.* (2017), p. 654.

Na fase crônica sintomática os infectados podem ser agrupados em três formas: cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; RASSI *et al.* 2017). A cardiopatia chagásica é uma das manifestações mais graves da doença (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Ela apresenta um perfil arritmogênico e diversos graus de acometimento do indivíduo, que vão de formas leves a cardiomegalias e falências cardíacas (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; BERN, 2015, RASSI *et al.* 2017). As formas digestivas envolvem prejuízos no

esôfago, intestino delgado e cólon, envolvendo seus plexos nervosos e a perda de suas funções, levando à dilatação obstrução dos mesmos (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; RASSI *et al.* 2017).

2.2 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde estima que oito milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* (WHO, 2018). Ainda de acordo com a instituição, a tripanossomíase americana provoca a morte de mais de 10.000 indivíduos por ano. O índice de detecção e de tratamento da enfermidade são baixos, de modo que menos de 10 por cento da população é diagnosticada no continente americano e cerca de um por cento é tratada (DNDi, 2018).

O modo de disseminação da doença de Chagas adquiriu novos perfis com a modificação dos hábitos humanos. A enfermidade estava presente em populações originárias das regiões do Chile e do Peru há cerca de 9000 anos e permaneceu, aparentemente, constante ao longo dos anos (AUFDERHEIDE *et al.* 2004). Segundo os autores, as formas de construção de habitações, com materiais naturais; a forma de preservação de corpos após a morte, envolvendo desmembração e possível ingestão de sangue contaminado, além da transmissão congênita, teriam sido favoráveis ao estabelecimento do ciclo doméstico da tripanossomíase. Os ritmos migratórios humanos disseminaram o protozoário para áreas não endêmicas, como países da América do Norte, Europa e Ásia (figura 4) (LIDANI *et al.* 2019).

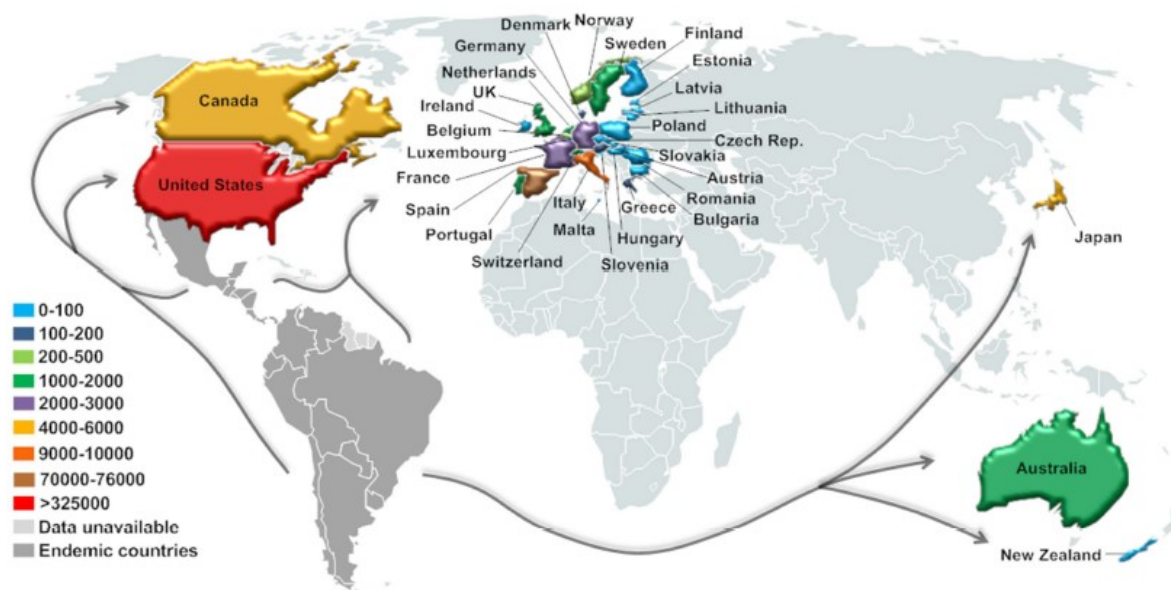


Figura 4: Distribuição de imigrantes acometidos com infecções pelo *T. cruzi* na América do Norte, Europa, Ásia e Oceania.

Ilustração mostrando o número de imigrantes infectados pelo parasito em diversos países do mundo. Cada cor representa uma quantidade específica de imigrantes infectados. Fonte: Adaptado de Lidani *et al.* (2019), p. 8.

Há formas alternativas de propagação da infecção. Elas incluem a ingestão de alimentos *in natura* contaminados, como os caldos de açaí e cana-de-açúcar; as transfusões sanguíneas e de hemoderivados não liofilizados; os transplantes de órgãos; pelas vias sexual, placentária ou pelo canal do parto, tal como por acidentes laboratoriais (PRATA, 2001; COURA & DIAS, 2009).

2.3 Classificação taxonômica e filogenia de *T. cruzi*

O *T. cruzi* é um organismo eucarioto, do filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, subclasse Metakinetoplastina; ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* e subgênero *Schizotrypanum* (NCBI Taxonomy ID: 5693) (SCHOCH *et al.* 2020).

A espécie se apresenta como sendo clonal, com eventos raros de hibridização, o que permitiu a divergência de linhagens separadas (ANDRADE, 1999). Várias formas de estudar tais linhagens foram reportadas ao longo do tempo, sendo baseadas em: comportamentos biológicos, perfis enzimáticos, em características genéticas dos DNAs genômicos e mitocondriais, além de polimorfismos nos RNAs ribossômicos (ANDRADE, 1999). Essas classificações

foram unificadas sob o título de Unidades Discretas de Tipificação (*discrete typing units*, DTUs), ou seja, “grupos de organismos que têm mais similaridades entre si do que com outros” e se baseiam em caracterizações genéticas, moleculares e imunológicas comuns que podem ser identificadas por marcadores específicos (ZINGALES *et al.* 2009; WESTENBERGER *et al.* 2005). Inicialmente as DTUs compreendiam apenas dois grandes grupos: *T. cruzi* I e II, o último com uma série de subdivisões, com cepas de naturezas não híbridas e híbridas, que possibilitaram a identificação de grupos parentais e derivados do tripanossomo (WESTENBERGER *et al.* 2005). Segundo Zingales *et al.* (2012), dois modelos para a evolução do protozoário são propostos (figura 5).

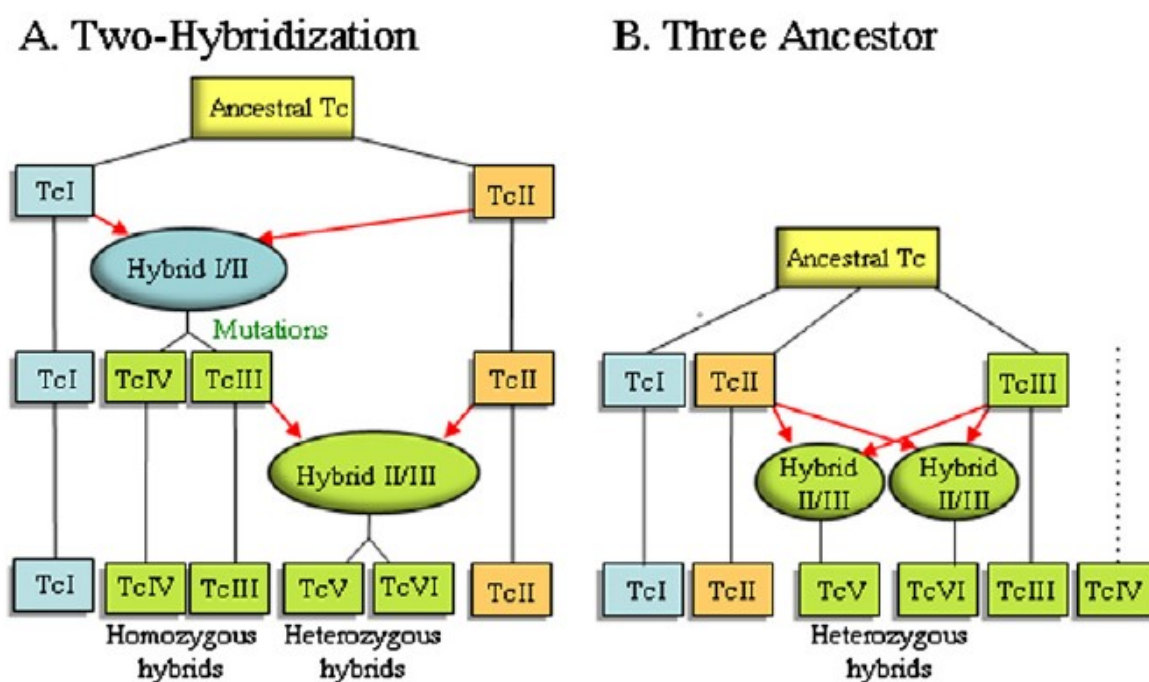


Figura 5: Modelos evolutivos de origem dos grupos de *T. cruzi*.

TcI-VI: grupos de *T. cruzi* com características biológicas que permitem seu agrupamento em unidades discretas de tipificação (DTUs), sendo que as origens para isso divergem conforme os modelos A (dois eventos de hibridização – *two-hybridization*) e B (três ancestrais – *three ancestor*). Fonte: Zingales *et al.* (2012), p. 242.

Existem sete DTUs descritas: I, II, III, IV, V, VI e Tcbat, sendo que a última exibe características genéticas distintas dos outros grupos e não se desenvolve bem em vetores invertebrados típicos de criações laboratoriais, como *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (ZINGALES *et al.* 2012). As

distribuições geográficas e o caráter doméstico ou silvestre de cada grupo podem ser observados na (figura 6).

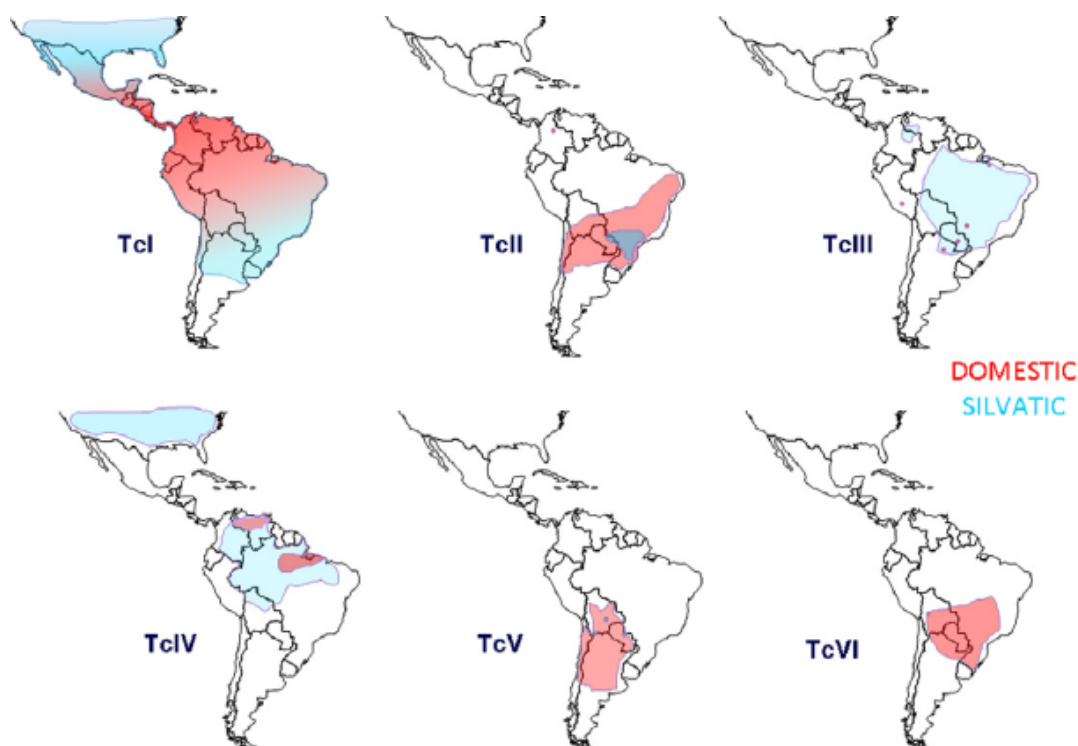


Figura 6: Ciclos domésticos e silvestres de *T. cruzi* na América Latina e Estados Unidos.

TcI: ciclo doméstico no norte da América do Sul, América Central e sul do México e silvestre, no sul estadunidense e norte mexicano. TcII: ciclo doméstico na América do Sul central e silvestre, no sul do Brasil. TcIII: ciclo doméstico disperso em regiões do Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e silvestre, na região central da América do Sul, Colômbia e Venezuela. TcIV: ciclo doméstico no norte brasileiro e venezuelano e silvestre, na região norte da América do Sul e sul estadunidense. TcV: ciclo doméstico na Argentina, Bolívia, Paraguai e Chile e silvestre, em pontos dispersos pela Bolívia e Paraguai. TcVI: ciclo doméstico as regiões centrais e sul do Brasil, no Paraguai, leste boliviano e norte argentino. Fonte: Zingales *et al.*(2012), p. 243.

Outros grupos de pesquisa sugerem que a classificação das DTUs necessita ser mais bem avaliada e incluir áreas geográficas de estudo extensas (BARNABÉ *et al.* 2016). Com base em três genes, dados presentes na literatura e usando técnicas estatísticas para a construção de árvores filogenéticas, os autores propõem o agrupamento de *T. cruzi* em mtTcI, mtTcII e mtTcIII (BARNABÉ *et al.* 2016). De modo que os grupos I e II têm grande distância evolutiva e o último uma posição intermediária entre ambos. São reportados eventos de introgressão de genes mitocondriais de TcIII em uma das cepas pertencentes à DTU I (BARNABÉ *et al.*

2016). A nova proposição classificatória tem como objetivo mostrar que a evolução do parasito envolve um cenário mais complexo do que o anteriormente proposto, envolvendo redes filogenéticas, já que os eventos têm relação com evolução reticulada, como hibridização, mosaicismo e recombinação (BARNABÉ *et al.* 2016).

2.4 Espécies reativas do oxigênio (ROS)

As espécies reativas do oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) são substâncias derivadas do oxigênio e abrangem moléculas distintas que atuam como: radicais livres, não radicais, espécies reativas do nitrogênio (RNS), que podem ser ou não consideradas como ROS, e do cloro (RCIS) (figura 7) (LI; JIA & TRUSH, 2016; HERB & SCHRAMM, 2021).

Essas moléculas funcionam em muitos casos como sinalizadoras, atuando como segundos-mensageiros (NORDZIEKE & MEDRAÑO-FERNANDEZ, 2018). A capacidade delas de transmitir os sinais depende de suas reatividades químicas, da meias-vidas e capacidade de cruzarem membranas celulares (NORDZIEKE & MEDRAÑO-FERNANDEZ, 2018).

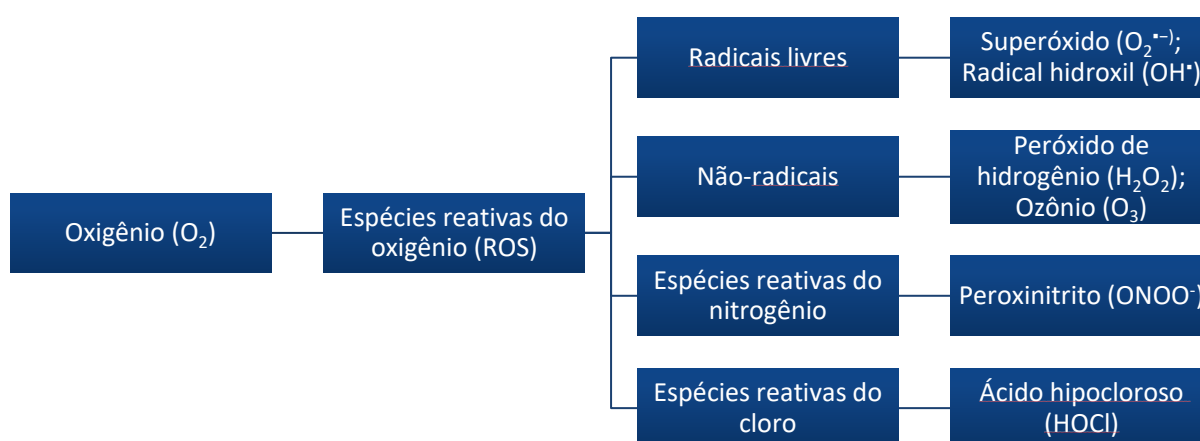


Figura 7: Classificação das espécies reativas do oxigênio e exemplos de moléculas em cada categoria.

A figura ilustra os tipos de espécies reativas de oxigênio e seus representantes em cada categoria. Fonte: Da autora, baseada na classificação apresentada por Li, Jia, Trush (2016).

As membranas celulares podem funcionar como alvos para as espécies reativas do oxigênio (ROS), reagindo com tais substâncias, o que limita e compartimentaliza a ação dos últimos (figura 8) (NORDZIEKE & MEDRAÑO-FERNANDEZ, 2018; MÖLLER *et al.* 2019). Por outro lado, dependendo da natureza da molécula, elas são capazes de atravessar as membranas, fazendo com que mais locais possam ser afetados e que seus efeitos devam ser limitados, portanto, por outros agentes, como, por exemplo, pelos antioxidantes (NORDZIEKE & MEDRAÑO-FERNANDEZ, 2018; MÖLLER *et al.* 2019).

Há ainda outras espécies reativas diferentes das apresentadas acima. Uma delas é o sulfeto de hidrogênio (H_2S), que é uma molécula sinalizadora gasosa (*gasotransmitter*) (PAUL & SNYDER, 2012). Ele é permeável a membranas e tem ação de sulfidilação de resíduos de cisteína em proteínas (PAUL & SNYDER, 2012). O papel desses sinais parece ser tão relevante quanto os de fosforilação e nitrosilação. O H_2S atua geralmente na ativação da atividade enzimática, ao contrário do óxido nítrico (NO), o qual está envolvido em promover eventos inibitórios. A importância do H_2S e de seus derivados está relacionada com neuro e vasodilatação em mamíferos e com a síntese de cisteína em plantas, (PAUL & SNYDER, 2012; MÖLLER *et al.* 2019). O ânion hidrossulfeto (HS^-) é produto da reação de equilíbrio químico do H_2S , com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$) e hipoclorito (OCl^-), e teve canais iônicos descritos em uma espécie de procaríoto, e (PAUL & SNYDER, 2012; MÖLLER *et al.* 2019).

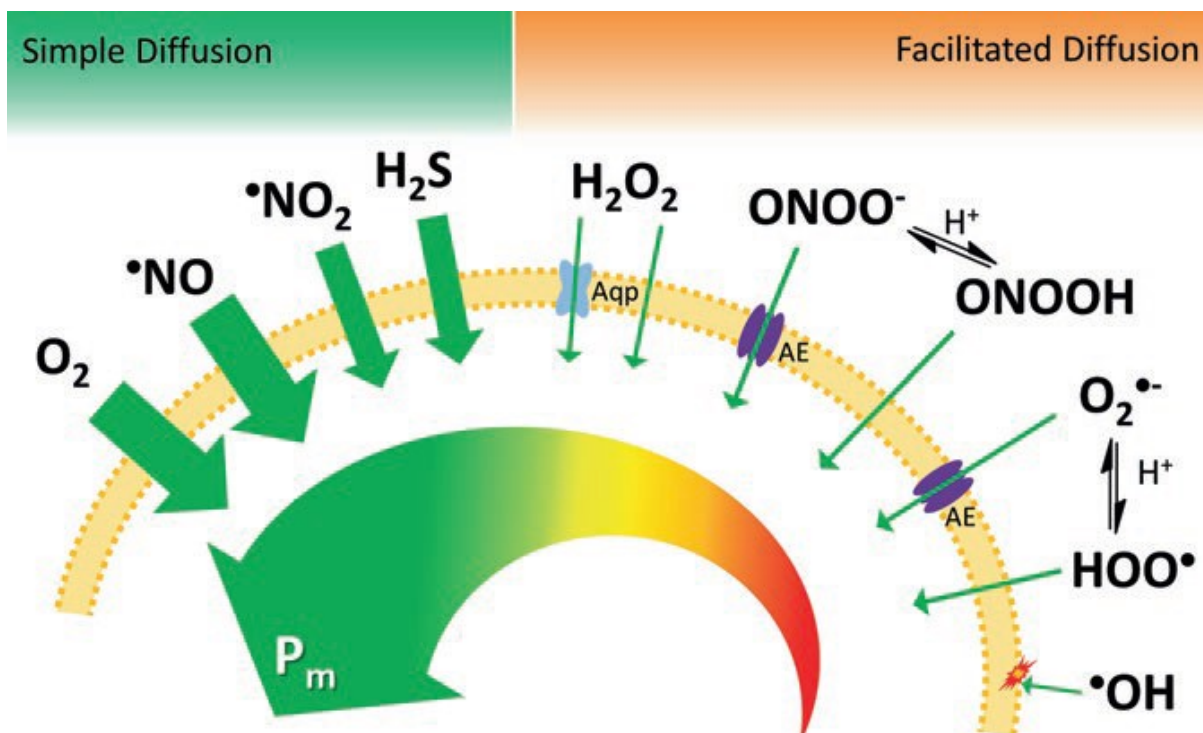


Figura 8: Permeabilidade de espécies reativas às membranas lipídicas.

A figura ilustra a capacidade de permeabilidade às membranas celulares dos diferentes tipos de espécies reativas de oxigênio. Quanto maior a espessura da seta, maior a capacidade de atravessar livremente a membrana. Para algumas espécies são mostrados os canais de passagem exigidos para seu transporte através da camada lipídica. Fonte: Möller *et al* (2019), p. 15.

2.5 Ações das espécies reativas do oxigênio (ROS) nos seres vivos

As espécies reativas do oxigênio (ROS) têm ações sobre diversos organismos. Em plantas, a sinalização por ROS afeta processos como morfogênese, gravitropismo e morte celular programada (CHMIELOWSKA-BAK; IZBIANSKA; DECKERT, 2015). Aparentemente, há um perfil geral de resposta ao estresse oxidativo e outro, distinto, para tipos específicos de ROS gerados em cada organela, embora isso ainda seja pouco claro (CHMIELOWSKA-BAK; IZBIANSKA; DECKERT, 2015). Em *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*, os estímulos com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e menadiona, a qual estimula a produção de superóxido ($O_2^{\bullet -}$) pelas mitocôndrias, foram responsáveis pela maior diferenciação, em cultura, de promastigotas em amastigotas, tal como pelo aumento de genes típicos desta forma de vida (KHAN; ANDREWS; MITTRA, 2018).

Os sinais produzidos pela ação das espécies reativas do oxigênio (ROS) nas células de mamíferos infectadas pelo *T. cruzi* também são variados. Romaña & Meyer (1942) reportam que macrófagos com características biológicas distintas

podem se comportar contribuindo para a morte dos parasitos ou permitindo que eles se dividam em seu interior. Tanaka; Tanowitz; Bloom (1983) apontaram que um clone da linhagem de macrófagos murinos J774, com capacidade reduzida de geração de espécies reativas do oxigênio, promoveu melhor desenvolvimento intracelular de protozoários incubados em sua presença (tripomastigotas e epimastigotas) do que outra linhagem sem prejuízo na geração da explosão oxidativa (*oxidative burst*).

Estudos do nosso grupo de pesquisa, por outro lado, demonstraram que cepas de *T. cruzi* de unidades discretas de tipificação (DTUs) I e II se comportam de maneira diferenciada a estímulos oxidantes (DIAS *et al.* 2017). A cepa JG (DTU II) foi capaz de gerar maior produção de espécies reativas do oxigênio em cardiomiócitos quando comparado com um clone da cepa Colombiana (clone 1.7G2, DTU I). Segundo este trabalho, JG se dividiu com maior intensidade no período de tempo observado (24h-72h pós-infecção), em cardiomiócitos murinos (BALB/c) ou humanos (iPCs diferenciados), do que o clone Col1.7G2. Quando as culturas infectadas com cada uma das linhagens parasitárias foram tratadas com a enzima antioxidante polietilenoglicol-catalase (PEG-catalase), houve redução na divisão de JG, mas não de Col.1.7G2. Em epimastigotas, o clone Col1.7G2 apresentou maiores níveis de enzimas antioxidantes, o que sugere uma possível maior proteção a agentes oxidantes do que JG. Em fibroblastos murinos embrionários (MEFs de C57BL/6) não houve diferenças em termos de proliferação dessas duas populações do parasito. No entanto, nesse tipo celular não foi observada produção de ROS pós-infecção. Dessa forma, o estudo concluiu que ROS poderia ser um sinalizador para o desenvolvimento intracelular de *T. cruzi*, mas não foi possível determinar se a quantidade de ROS produzida e/ou a cepa do parasito poderia interferir nesse processo de sinalização (DIAS *et al.* 2017).

Dos Santos *et al.* (2020) demonstraram o papel das ciclofilinas na produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) pelas células e sua correlação com a multiplicação de amastigotas intracelulares. Os autores estudaram a TcCyP19, uma ciclofilina que possui em torno de 72% de similaridade com CyPA, que é uma ciclofilina de mamíferos. Eles usaram linhagens de mioblastos L6 (*Rattus norvegicus*) modificadas para expressarem a ciclofilina parasitária e também *T. cruzi* modificados superexpressores transfectados com TcCyP19-HA (TcCyP19 com o

marcador de hemaglutinina), ou *knockdowns* para a proteína. O crescimento parasitário em células selvagens ou modificadas foi maior nos grupos em que a proteína estava sendo mais expressa e o mesmo ocorreu com os grupos parasitários alterados. A partir de 48 horas pós-infecção, TcCyP19-HA secretada pelas amastigotas foi detectada no citosol das células infectadas. A infectividade, entretanto, não foi alterada por esses parâmetros. A proteína estudada, assim como CyPA, se sobrepôs às marcações de p47^{phox}, parte do complexo NADPH oxidase 2 (NOX2), na região de membrana, sugerindo que a ciclofilina de *T. cruzi* em questão poderia ter um papel similar na translocação da subunidade em questão para ativação de NOX2, gerando um aumento de ROS no citosol.

A conversão entre formas de vida de *T. cruzi* está correlacionada com o pH e com a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) por esses protozoários. Foi demonstrado que a diferenciação em ambiente extracelular de tripomastigotas em amastigotas, realizada em meio ácido, foi favorecida por tratamentos com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), um agente oxidante, e revertida pela PEG-catalase (PAULA *et al.* 2020). Além disso, ainda segundo esse estudo, a produção de ROS durante o processo induzido de diferenciação foi reduzida na presença de ciclosporina A, que é inibidora de poros mitocondriais de permeabilidade transitórios (MPTs) (PAULA *et al.* 2020). Adicionalmente, tripomastigotas colocados para serem diferenciados por cinco horas em meio ácido secretaram um tipo específico de ciclofilina (TcCyP19), de modo que a de conversão entre as formas de vida de *T. cruzi* pode também ser influenciada por essas substâncias (dos SANTOS *et al.*, 2020).

Em outros patógenos, como no caso de *Mycobacterium abscessus*, glicopeptídiolipídios específicos associados à superfície (GPLs), são capazes de determinar o curso da doença, modulando o sistema imune e as respostas celulares (WHANG *et al.* 2017). A forma R (*rough*) do procarionto não apresenta os glicopeptídios específicos e é mais virulenta, provocando uma maior porcentagem de morte em macrófagos de linhagem e de culturas primárias (WHANG *et al.* 2017). A forma S (*smooth*), menos agressiva, é capaz de reduzir: a proporção de células apoptóticas, espécies reativas do oxigênio (ROS) e o baixo potencial de membrana induzido por oligomicina (WHANG *et al.* 2017). Os glicopeptídiolipídios específicos presentes nos tipos S exibiam natureza polar e se co-localizaram com a região

mitocondrial e com a ciclofilina D, que controla processos associados aos poros mitocondriais de permeabilidade transitórios (MPTs) (WHANG *et al.* 2017).

A produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) apresenta relação com alterações mitocondriais em diversas fases de vida do *T. cruzi* e/ou de seus hospedeiros. O acúmulo de cálcio dentro das mitocôndrias no parasito implica em alto estresse oxidativo em epimastigotas superexpressoras de canais uniporte mitocondriais de cálcio (TcMCU) e seu parálogo (TcMCUb) (CHIURILLO *et al.* 2017). No hospedeiro, Báez *et al.* (2013) verificaram alterações mitocondriais em miocárdios de camundongos Swiss infectados por duas cepas de *T. cruzi*, em fase crônica assintomáticas, em nível estrutural e enzimático e Lentini; Pacheco; Burleigh (2018) observaram o contato direto de amastigotas via flagelo com mitocôndrias dos hospedeiros, embora não tenham elucidado a função desse contato.

Levando isso em consideração, o estudo de *T. cruzi* em relação ao seu comportamento intracelular é um tema relevante. A literatura é extensa e abrangente. Dessa forma, o agrupamento da evidência científica com rigor e critério é uma ferramenta importante para se identificar lacunas e futuras pesquisas, otimizando esforços e recursos em tempos de abundância e de escassez.

3 INTRODUÇÃO ÀS REVISÕES DA LITERATURA COM BASE EM MEDICINA BASEADA EM EVIDÊNCIAS

Levando-se em conta a escassez de estudos dessa natureza na área de Biologia Celular da UFMG, julgou-se necessário apresentar em linhas gerais um capítulo para compreensão do contexto metodológico da pesquisa realizada.

3.1 Revisões bibliográficas: várias abordagens e técnicas

Existem vários tipos e classificações de estudos bibliográficos. Os objetivos e metodologias dessas revisões são distintos (GRANT & BOOTH, 2009). De um modo simplificado, as revisões da literatura podem ser classificadas em duas grandes famílias: das “revisões que mapeiam” e das “revisões que avaliam e sintetizam” (UNESP, 2015).

Segundo esse documento, no primeiro grupo se encontram as revisões narrativas. Estas agrupam dados e aprofundam-se em determinado tema, abordando suas diferentes perspectivas. Entretanto, não apresentam critérios de condução definidos e estão sujeitas às análises, escolhas e interpretações dos autores.

Por outro lado, as revisões de mapeamento têm definidas hipóteses, bem como critérios de pesquisa e inclusão de estudos, gerando resultados mais reprodutíveis, mitigando tendências em diferentes etapas da pesquisa (UNESP, 2015).

As revisões sistemáticas se enquadram no segundo grupo descrito. São estudos secundários que sintetizam o enorme volume de evidências científicas disponíveis na literatura sobre determinado tema (LASSERSON, THOMAS, HIGGINS, 2020). Elas apresentam critérios de pesquisa definidos *a priori*, sob a forma de protocolos para evitar vieses na condução do estudo, por exemplo, com base nos resultados identificados nos artigos ou nestes por si só (LASSERSON; THOMAS, HIGGINS, 2020). Além disso, devem ser reprodutíveis, tal como acontece no desenrolar de uma pesquisa de natureza primária, como os experimentos laboratoriais ou os ensaios clínicos (LASSERSON; THOMAS; HIGGINS, 2020).

Dessa maneira, qualificam-se como trabalhos científicos de natureza teórica (MARCONI & LAKATOS, 2003).

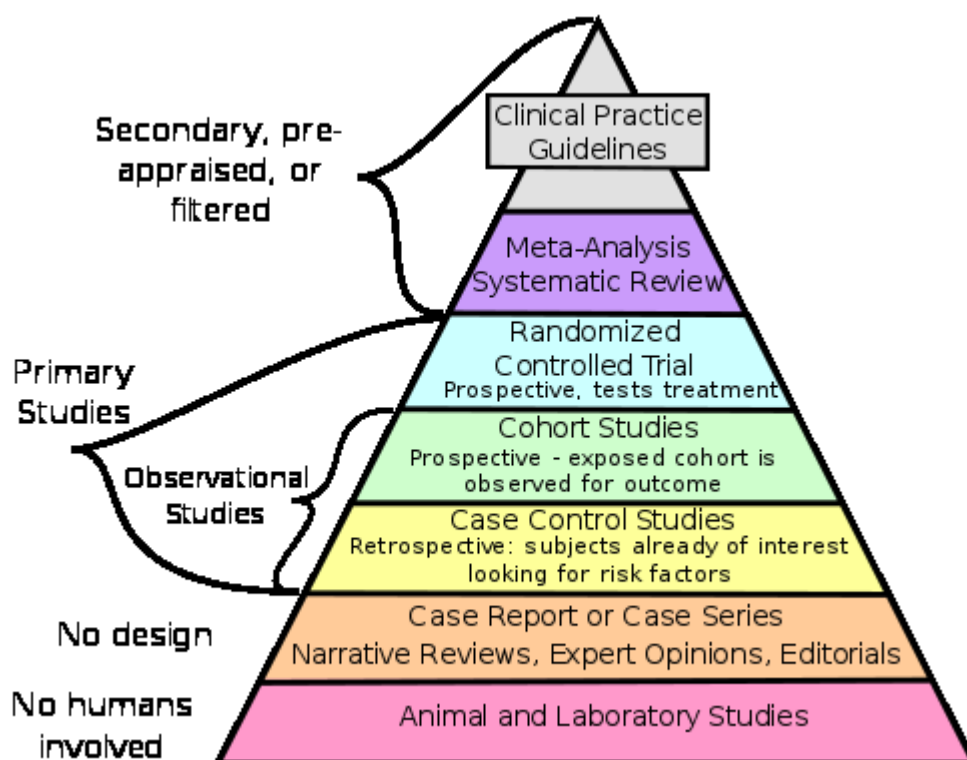


Figura 9: Hierarquia dos níveis de evidência científica.

A ilustração representa os níveis de hierarquia em relação às evidências científicas. De baixo para cima: estudos *in vitro* e *in vivo*; relatos de caso; revisões narrativas, opiniões de especialista editoriais; estudos de caso-controle; estudos de coorte; estudo clínico controlado aleatorizado; meta-análise e revisões sistemáticas; guias e práticas clínicas. Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/36/Research_design_and_evidence.svg/512px-Research_design_and_evidence.svg.png> Acesso 27 jan. 2021

3.2 Críticas epistemológicas à hierarquização e à “medicina baseada em evidências”

A medicina baseada em evidências utiliza das revisões sistemáticas, e consiste em pesquisas com populações humanas e idealmente em ensaios clínicos randomizados, a fim de obter o “melhor nível de evidência”. Hjørland (2011), entretanto, faz críticas do ponto de vista da filosofia da ciência e da teoria do conhecimento acerca das práticas englobadas por esse campo e da hierarquia apresentada anteriormente. A primeira delas diz respeito ao que seria considerado como “melhor” e que haveria variações sobre isso conforme as diversas posições dos autores dependendo se suas concepções filosóficas, como positivistas, racionalistas, teóricos críticos. Algumas ponderações foram feitas a respeito das consequências desses estudos quando financiados por indústrias de medicamentos, em vez de instituições de pesquisa independentes, como as universidades, por exemplo (HJØRLAND, 2011). Um exemplo seriam estudos em que se comparam os efeitos de um fármaco novo com um placebo, ao invés de se comparar com o medicamento padrão-ouro para a determinada doença (HJØRLAND, 2011). De modo que, na prática, a sociedade não se beneficiará com tratamentos melhores, mas a indústria, sim, com uma nova patente (HJØRLAND, 2011). É importante destacar que a crítica feita pelo autor não remete à validade dos resultados, mas ao ponto de vista de benefício social por eles revertido. Outro tópico seria a respeito do fato de que os dados não falam por si mesmos e necessitam de interpretações com base em teorias prévias e também que o conhecimento científico é um reflexo de seu tempo, de forma que experimentos antigos não poderiam ser colocados em paralelo com os novos, pois seriam feitos sob uma perspectiva distinta (HJØRLAND, 2011).

4 JUSTIFICATIVA

Os primórdios da “medicina translacional” surgiram na segunda metade do século XIX, com Claude Bertrand, que sugeriu que doenças induzidas em animais poderiam ser comparadas com enfermidades similares em humanos (FAGUNDES & TAHA, 2004). O uso de animais como modelos reduz as limitações de pesquisas

com grupos de pessoas, já que, pesquisas com humanos geralmente são demoradas e necessitam de muitos recursos econômicos e logísticos (RIBEIRO, 2014). Elas envolvem o consentimento dos pacientes, passam pelo crivo de comitês de ética, por várias etapas de avaliação dos resultados, precisam ter um número adequado de participantes e estes devem estar dispostos a permanecer na investigação até o final (FAGUNDES & TAHA, 2004). Um exemplo prático são os estudos clínicos randomizados duplo-cegos, que estão sendo desenvolvidos na busca por uma vacina contra o Sars-Cov2, causador da COVID-19. Outro ponto a ser considerado são as coletas de dados. Elas podem ser necessárias a curtos intervalos de tempo, serem invasivas, incômodas e/ou a doença investigada pode ter baixa prevalência na população, sendo, portanto, uma etapa difícil de ser conduzida (FAGUNDES & TAHA, 2004).

O campo de estudo que visa agrupar dados de pesquisas pré-clínicas na forma de revisões sistemáticas com ou sem meta-análises é relativamente novo (SENA *et al.* 2014). Ao contrário daqueles de natureza clínica, que visam investigar efeitos de tratamentos ou intervenções para serem convertidos em práticas médicas, tal como influenciar em políticas em saúde pública, dois passos atrás são dados na área laboratorial.

As revisões sistemáticas permitem a identificação da qualidade metodológica dos estudos pré-clínicos, de seu poder estatístico e de sua validade interna, ou seja, de que as variáveis que geram o efeito observado são controladas e não o resultado de fatores externos, que possam estar influenciando no resultado (SENA *et al.* 2014). Entender esses fatores pode contribuir para uma transposição melhor dos estudos de bancada para a clínica, minimizando talvez a máxima de “tudo funciona nos animais, mas nada funciona em humanos” (SENA *et al.* 2014).

As revisões sistemáticas podem, dessa forma, auxiliar na organização de dados e compreensão de efeitos diversos dentro da biologia, para posterior transposição para modelos mais complexos. No campo da pesquisa básica, o valor dos estudos com células e animais se reflete no melhor entendimento de seu modelo de estudo, como, por exemplo, as interações parasito-hospedeiro na doença de Chagas, as quais são complexas e multifatoriais (CHATELAIN & SCANDALE, 2020).

Uma delas diz respeito às respostas geradas por *T. cruzi* frente ao estresse oxidativo, que são ainda controversas e se apresentam como um campo de pesquisa emergente, já que desafia o paradigma antes vigente de que as espécies reativas do oxigênio (ROS) somente controlariam a infecção parasitária. De acordo com dados prévios do nosso grupo, como descrito em Dias *et al.* (2017), cepas pertencentes à DTUs distintas se comportaram de forma diferente frente ao estímulo de ROS. No entanto, não foi possível determinar se essas diferenças foram devidas a quantidade de ROS induzida e disponível após a infecção ou a real diferença na sensibilidade das duas cepas frente ao estímulo por essas moléculas. Decidimos, portanto, analisar os dados disponíveis na literatura e avaliar os efeitos das espécies reativas do oxigênio (ROS) na infecção celular pelo *T. cruzi* por meio das revisões em questão.

5 INTRODUÇÃO AOS MÉTODOS ESTATÍSTICOS DAS REVISÕES SISTEMÁTICAS COM META-ANÁLISES

Esse capítulo visa facilitar a compreensão do leitor acerca do processo metodológico das Revisões Sistemáticas com Meta-análises descrito no item 7. Materiais e Métodos. Os conceitos introduzidos a seguir foram aplicados na condução desse trabalho, julgando-se, portanto, relevante sua explanação.

5.1 Revisões sistemáticas e meta-análises: modelos e métodos

Os processos de revisão sistemática são complexos. Eles podem ser amplos e sensíveis, resgatando uma quantidade substancial de dados, ou específicos, mas com menor sensibilidade (MACLEOD *et al.* 2019). A maioria das revisões recupera em torno de 10% a 20% de resultados relevantes e elas podem ou não incluir meta-análises (BRASIL, 2012; MACLEOD *et al.* 2019). Tais estudos devem ser conduzidos de forma a minimizar de erros sistemáticos, ou seja, vieses, que podem ser provenientes de várias fontes, como na condução dos estudos primários e/ou durante o processo de revisão (BOUTRON *et al.* 2021). Ainda segundo os autores, há vieses relativos à direção do efeito do estudo, de modo que resultados não estatisticamente significativos e/ou desfavoráveis para a intervenção são menos

prováveis de serem publicados (viés de publicação ou reportagem seletiva). Os estudos ditos “significativos” são divulgados em maior proporção, mais rapidamente (vieses de *time-lag*), e costumeiramente com tamanhos de estimativas de efeito maiores, o que implica em publicações em revistas consideradas “melhores” (viés de localização), como aquelas indexadas e internacionais (viés de linguagem, geralmente *journals* de língua inglesa), fazendo com que estas sejam mais recuperadas nas bases de dados (viés de localização) e citadas (BOUTRON *et al.* 2021). Assim, é importante mensurar o risco de tais erros nos estudos incluídos para se indicar o nível de confiança da revisão sistemática realizada.

O termo “meta-análise” foi cunhado, em 1976, por Gene Glass, que o definiu como “uma análise estatística de uma grande coleção de resultados de análises de estudos individuais com o propósito de integrar os achados” (O’ROURKE, 2007). Elas se viabilizaram por conta dos estudos de probabilidade que se iniciaram no século XVIII (O’ROURKE, 2007). Segundo o autor, essa técnica se desenvolveu e evoluiu durante o século XX, decorrente dos trabalhos de vários estudiosos e de campos de investigação, com destaque para Karl Pearson, que agrupou dados de estudos de vacinação de soldados contra febre tifoide; Ronald Fischer, que analisou estudos relacionados a fertilizantes e agricultura; William Cochran e Frank Yates, que se aprofundaram nos modelos de efeitos aleatórios; Peter Elwood e Archie Cochrane, os quais realizaram meta-análises de estudos clínicos randomizados sobre o uso de medicamentos em doença cardíaca.

5.2 Modelo de Efeitos Aleatórios ou Randômicos e Modelo de Efeitos Fixos

Os Modelos de Efeitos Aleatórios ou Fixos dependerão da natureza dos dados prevista no estudo. Em casos de ausência de heterogeneidade entre os eles, os resultados de meta-análise serão similares para ambos os modelos (BRASIL, 2012). Embora esse critério de heterogeneidade inexistente seja difícil de ocorrer na prática.

O Modelo de Efeitos Aleatórios considera que há variações entre e dentro dos estudos e que “[...] não há um único valor que estima a metanálise e sim uma distribuição de números” (BRASIL, 2012; RODRIGUES, 2010). A condução dos trabalhos não é necessariamente idêntica e se assume que os efeitos das

intervenções seguem uma distribuição normal, de maneira que a heterogeneidade existente é resultado de diferenças entre os efeitos das intervenções nos estudos e também ao acaso (RODRIGUES, 2010; DEEKS, HIGGINS, ALTMAN, 2021). As conclusões obtidas podem, portanto, ser extrapoladas para outras populações (RODRIGUES, 2010).

É um modelo mais conservador e indicado para casos em que a heterogeneidade entre os estudos está presente, gerando resultados com intervalo de confiança mais amplo (BRASIL, 2012). Quando há presença de heterogeneidade, esse modelo atribui pesos maiores para estudos menores e quando o tamanho e a direção dos efeitos são também pequenos, pode pesar o resultado para tais estudos, em detrimento dos maiores (DEEKS, HIGGINS, ALTMAN, 2021). Além disso, quando a meta-análise possui poucos trabalhos, ele provê estimativas precárias para a largura da distribuição dos efeitos (DEEKS, HIGGINS, ALTMAN, 2021). A variância entre estudos nesse modelo é medida por Tau^2 (DEEKS, HIGGINS, ALTMAN, 2021).

O Modelo de Efeitos Fixos, por sua vez, pressupõe que se há um efeito idêntico, único, de tratamento entre os estudos, ignora a heterogeneidade estatística entre eles e pressupõe que foram realizados de modo similar para uma população específica (RODRIGUES, 2010; BRASIL, 2012; DEEKS, HIGGINS, ALTMAN, 2021). “[...] As diferenças entre as estimativas de efeito dos estudos são atribuídas meramente ao acaso [...]”, assim, com o aumento infinito do n-amostral de cada estudo estimativas de efeito idênticas seriam observadas (BRASIL, 2012). As conclusões não devem ser extrapoladas para outras populações (RODRIGUES, 2010).

Segundo Rodrigues (2010), a escolha entre esses modelos não é uma tarefa fácil e alguns pontos devem ser considerados. Um deles é o efeito de tratamento e o modo de realização dos estudos incluídos, conforme citado no tópico anterior. Outra forma é se considerar a heterogeneidade dos dados, a qual deve ser prevista ou verificada *a priori*. A autora, contudo, pondera que, se o número de estudos presentes na revisão sistemática incluídos na meta-análise for pequeno, as estimativas de variância pelo Modelo de Efeitos Aleatórios pode não ser precisa. Ela sugere que se relatem os efeitos de cada estudo separadamente, sem uma medida geral de efeito; opte-se pelo modelo de efeitos fixos, sem realizar extrapolações para

outras populações ou se considere uma abordagem Bayesiana, a qual estima a variância por dados externos e dos estudos incluídos.

5.3 Método do Inverso da Variância

O método do Inverso de Variância é um dos muitos utilizados para a ponderação das estimativas de efeito (BRASIL, 2012). Pode ser utilizado para dados contínuos ou dicotômicos e com os modelos estatísticos anteriormente descritos (BRASIL, 2012). A variância é inversamente proporcional à importância desse estudo (BRASIL, 2012). Para detalhes sobre cálculos, verifique o APÊNDICE C.

5.4 Testes de heterogeneidade

Há dois testes para a avaliação da heterogeneidade presente nas meta-análises. O teste do qui-quadrado (X^2 ou Chi^2) e o teste o I-quadrado (Teste de Higgins e Thompson)

O teste do qui-quadrado (X^2 ou Chi^2) verifica se as diferenças observadas são devidas ao acaso. Um valor de P reduzido ou X^2 com valor elevado em relação aos seus graus de liberdade (df) indicam que a heterogeneidade dos efeitos das variações nas intervenções não são relativas ao acaso (DEEKS & HIGGINS, 2010; HIGGINS & GREEN, 2011). Possui baixo poder estatístico quando a meta-análise possui pequeno tamanho amostral ou é pequena em número de estudos (DEEKS & HIGGINS, 2010; HIGGINS & GREEN, 2011). Desse modo, “quando um significado estatisticamente significativo pode indicar um problema com heterogeneidade, um resultado não significativo não deve ser tomado como evidência de ausência de heterogeneidade” (DEEKS & HIGGINS, 2010; HIGGINS & GREEN, 2011). Devido a isso, muitas vezes, se usa um valor de $P=0,10$, em vez de $P=0,05$ para a determinação da significância estatística (DEEKS & HIGGINS, 2010; HIGGINS & GREEN, 2011).

Alguns autores questionam que a heterogeneidade é inevitável, em virtude da diversidade clínica e metodológica. Então, propõem outros testes que visam determinar o impacto desse parâmetro na meta-análise, em vez de sua simples

presença ou ausência, um desses testes é do I^2 (APÊNDICE C). (DEEKS & HIGGINS, 2010; HIGGINS & GREEN, 2011).

6 PERGUNTA DE PESQUISA

Como as espécies reativas do oxigênio (ROS) afetam a multiplicação de *T. cruzi* em modelos pré-clínicos *in vitro*?

6.1 Objetivo geral

Realizar uma síntese da evidência científica de estudos pré-clínicos com relação à multiplicação intracelular de amastigotas de *T. cruzi* em hospedeiros vertebrados.

6.1.1 *Objetivos Específicos*

- Avaliar se os perfis de multiplicação de cepas de *T. cruzi* pertencentes a cepas distintas de *T. cruzi* se comportam em ambientes intracelulares oxidantes ou redutores;
- Verificar se os perfis de multiplicação de *T. cruzi* em ambientes oxidantes ou redutores se correlacionam com suas unidades discretas de tipificação (DTUs I e II);
- Realizar a síntese da evidência científica por meio de uma revisão sistemática da literatura.

6.2 Hipóteses

- **H0:** não haverá diferenças entre os ambientes intracelulares para a replicação parasitária de isolados distintos de *T. cruzi*;
- **H1:** haverá diferenças entre os ambientes intracelulares para a replicação parasitária de isolados distintos de *T. cruzi* favorecendo ambientes mais oxidantes;
- **H2:** haverá diferenças entre os ambientes intracelulares para a replicação parasitária favorecendo ambientes mais redutores em diferentes isolados de *T. cruzi*.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Base de dados e estratégia de busca

Realizaram-se buscas nas bases de dados relacionadas a dados biológicos e biomédicos PubMed (NCBI) e Embase (Elsevier) até o dia 06 de setembro de 2020, sendo que o acesso da última se deu por meio do *Portal Periódicos CAPES/MEC*. Fizeram-se combinações dos termos seguintes, com certas variações para se obter o maior número possível de referências sobre o tema: “Trypanosoma cruzi”, “Chagas disease”, “Reactive Oxygen Species”, “Reactive Oxygen Metabolites”, “ROS”, “Free radicals”. Não se utilizou restrições de idiomas nas buscas dentro das bases de dados.

7.1.1 Estratégias de busca

A estratégia de busca foi inicialmente estabelecida para a primeira base descrita (MesH [Mh], Title and Abstract [TIAB], busca simples) e depois adaptada para a segunda, utilizando estratégias correspondentes (Emtree, ab,ti; termos expandidos). Utilizou-se o acrônimo PICO (*Population, Intervention, Comparison, Outcome*) para auxiliar na construção da estratégia de busca a partir da pergunta de pesquisa:

População: *Trypanosoma cruzi*; **Intervenção:** presença de espécies reativas do oxigênio (ROS). Os termos "comparação" e "desfechos" não foram incluídos na busca para se evitar restrições no número de artigos recuperados.

PubMed (com o filtro *Best Match*)

((("Trypanosoma cruzi"[MH] OR "Trypanosoma cruzi"[TIAB] OR "Trypanosoma cruzi" OR "T. cruzi"[TIAB] OR "T. cruzi" OR "Chagas disease"[MH] OR "Chagas disease"[TIAB] OR "Chagas disease" OR "American trypanosomiasis"[MH] OR "American trypanosomiasis"[TIAB] OR "American trypanosomiasis")) AND ((("Reactive oxygen species"[MH] OR "Reactive oxygen species"[TIAB] OR "Reactive oxygen species" OR "Reactive oxygen metabolite"[TIAB] OR "Reactive oxygen metabolite" OR "ROS" OR "ROM" OR Oxygen Species, Reactive[MH] OR Oxygen Species, Reactive[TIAB] OR Oxygen Species, Reactive OR Active Oxygen[MH] OR Active Oxygen[TIAB] OR Active Oxygen OR Oxygen, Active[MH] OR Oxygen, Active[TIAB] OR Oxygen, Active OR Oxygen Radicals[MH] OR Oxygen Radicals[TIAB] OR Oxygen Radicals OR Pro-Oxidants[MH] OR Pro-Oxidants[TIAB] OR Pro-Oxidants OR Pro Oxidants[MH] OR Pro Oxidants[TIAB] OR Pro Oxidants OR "Free radicals"[MH] OR "Free radicals"[TIAB] OR "Free radicals" OR "Oxygen compounds"[MH] OR "Oxygen compounds"[TIAB] OR "Oxygen compounds"))))

Embase

('trypanosoma cruzi':ti,ab OR 't. cruzi':ti,ab OR 'trypanosoma cruzi'/exp OR 'trypanosoma cruzi' OR 't. cruzi' OR 'chagas disease':ab,ti OR 'chagas disease'/exp OR 'chagas disease') AND ('reactive oxygen metabolite':ab,ti OR 'reactive oxygen metabolite'/exp OR 'reactive oxygen metabolite' OR 'reactive oxygen species ros' OR 'ros'/exp OR ros OR 'free radical':ab,ti OR 'free radical'/exp OR 'free radical' OR 'oxidative stress':ab,ti OR 'oxidative stress'/exp OR 'oxidative stress') AND [embase]/lim

7.2 Gerenciamento das referências obtidas

As referências dos artigos foram exportadas para o programa Mendeley, versão 1.19.4 de cada uma das bases no dia 06 de setembro de 2020 para o agrupamento e avaliação das referências bibliográficas obtidas.

7.3 Critérios para a inclusão ou exclusão das referências no estudo

Os itens descritos a seguir servem para a realização da seleção dos estudos a serem incluídos na revisão sistemática da literatura, ou seja, para verificar se os estudos são adequados à pergunta de pesquisa e ao desenho experimental inicialmente predefinido. Os critérios apresentados abaixo, definidos *a posteriori*, se justificam pela melhor adequação dos métodos utilizados com a pergunta de pesquisa.

7.3.1 Critérios de exclusão

- Organismos diferentes de *T. cruzi*;
- Estudos realizados em humanos;
- Estudos realizados em não-mamíferos;
- Estudos secundários (revisões bibliográficas de naturezas diversas, revisões sistemáticas, livros e capítulos);
- Comentários e editoriais;
- Não relacionados com estresse oxidativo ou ROS;
- Estudos em que óxido nítrico ou apenas citocinas foram estudados sem mencionar ROS/ sua indução ou antioxidantes;
- Estudos de exclusivamente moleculares como: transcriptômica, proteômica, de atividade e/ou cinética enzimáticas;
- Estudos exclusivamente realizados em epimastigotas;
- Infecções/co-culturas de epimastigotas em animais ou células (definido *a posteriori*);
- Estudos que não envolviam infecções experimentais em células ou animais;

- Estudos realizados em modelos jovens ou idosos (ex.: neonatos, animais não adultos, células de natureza embrionária);
- Estudos em que o objetivo era avaliar somente os efeitos da doença (ex.: parâmetros cardíacos, marcadores moleculares presentes no soro.), sem infecções ou sem avaliar a carga parasitária;
- Estudos exclusivos com tripomastigotas (definição do critério *a posteriori*);
- Estudos com amastigotas extracelulares (cultivo axênico) sem interações com células de mamíferos.

7.3.2 Critérios de inclusão

- Estudos primários;
- Estudos *in vitro* (ex.: cultivos celulares, histológicos);
- Estudos em modelos adultos (tecidos e células de animais adultos);
- Estudos que avaliaram a ação das espécies reativas do oxigênio (ROS) por meios diversos seja por sua promoção ou inibição (ex.: tratamento de animais ou células com ROS/antioxidantes; tratamentos com indutores de vias de ROS/antioxidantes);
- Estudos com *T. cruzi* pertencentes às DTUs I e II (critério definido *a posteriori*).

7.4 Triagem dos estudos

7.4.1 Triagem inicial

A avaliação dos documentos foi feita em várias etapas. A primeira delas visava excluir artigos pouco relacionados com a doença de Chagas, sendo feita por meio da avaliação das palavras-chave e título das referências recuperadas, seja por seguimento da lista de textos disponível, seja por digitação de possíveis palavras-chave na caixa de busca do gerenciador de artigos Mendeley (figura 10). A leitura do resumo foi feita rapidamente a fim de se confirmar a exclusão. Caso o artigo apresentasse potencial para a inclusão, ele era mantido na lista para avaliação posterior.

<p>Termos usados na caixa de busca do Mendeley Desktop para a exclusão de artigos por palavras-chave/tema: NO, Reviews, Leishmania, Proteomic, Transcriptomic, Insect Stage, Patients, Enzyme Activity, Humans, Enzyme Assay, Epimastigotes Amastigotes, Amastigote Trypomastigote, Free Radical</p>
<p>Termos usados na seleção para inclusão de Estudos Division, multiplication, growth, intracellular multiplication, Epimastigotes amastigotes, Amastigote Trypomastigote, Free radical</p>

Figura 10: Exemplo de descrição da Exclusão e Inclusão por Palavras-chave/Tema.

Não necessariamente a presença do termo indica a inclusão do artigo. O uso de termos chave foi feito como forma de facilitar o processo inicial de triagem dos estudos para a subsequente avaliação de metodologia nos textos. Fonte: Da autora

7.4.2 *Triagem secundária e terciária*

Após a exclusão de artigos pouco específicos, foi feita a avaliação dos resumos dos restantes e nova etapa de seleção foi realizada. Em caso de adequação ao tema de pesquisa, eles foram mantidos para a posterior leitura da metodologia.

Na última fase, o processo de inclusão e exclusão foi feito de modo simultâneo com a extração de dados, ou seja, os artigos que tiveram as metodologias avaliadas e se adequaram aos critérios de inclusão tiveram seus dados extraídos, após leitura do texto completo.

7.4.3 *Obtenção de textos completos e incompletos*

As referências bibliográficas completas foram obtidas por meio do convênio institucional da Universidade Federal de Minas Gerais por via eletrônica do *Portal Periódicos CAPES/MEC* com as bases de dados, editoras e revistas científicas nacionais e internacionais. Em caso de estudos com textos completos indisponíveis pelas vias anteriores, tentou-se o contato com os autores pelo *site Researchgate* por ser uma plataforma voltada para a comunicação científica. Em caso de indisponibilidade dos mesmos, o texto foi excluído.

7.4.4 Extração de dados dos gráficos dos artigos científicos

Devido à necessidade de obter dados precisos e à ausência de dados em forma de tabelas na maioria dos artigos científicos, foi preciso se utilizar de ferramentas auxiliares para a obtenção dos dados. Estes foram extraídos dos estudos primários por meio do *software online* e gratuito *WebPlotDigitizer*, versão 4.4., Pacifica, Califórnia, EUA, desenvolvido por Ankit Rohatgi.

Essa ferramenta permite a calibração das imagens com base em escalas numéricas conhecidas para a obtenção de valores exatos de médias e desvios. Os gráficos de cada artigo presente na análise foram inicialmente importados para o programa *WebPlotDigitizer (online)* e calibrados por meio dos botões *align X-Y axes* e *align bar chart axes* (figura 11). Posteriormente, atribuíram-se os valores presentes nas escalas dos gráficos dos artigos às variáveis X e Y (figura 12). Em gráficos de barras, é necessário realizar o processo em apenas um dos eixos e, aquele sem calibração ou valores atribuídos, pode-se ou deixá-lo vazio, ou se colocar uma nomenclatura fixa, como, por exemplo, uma data. Optou-se pela primeira opção.

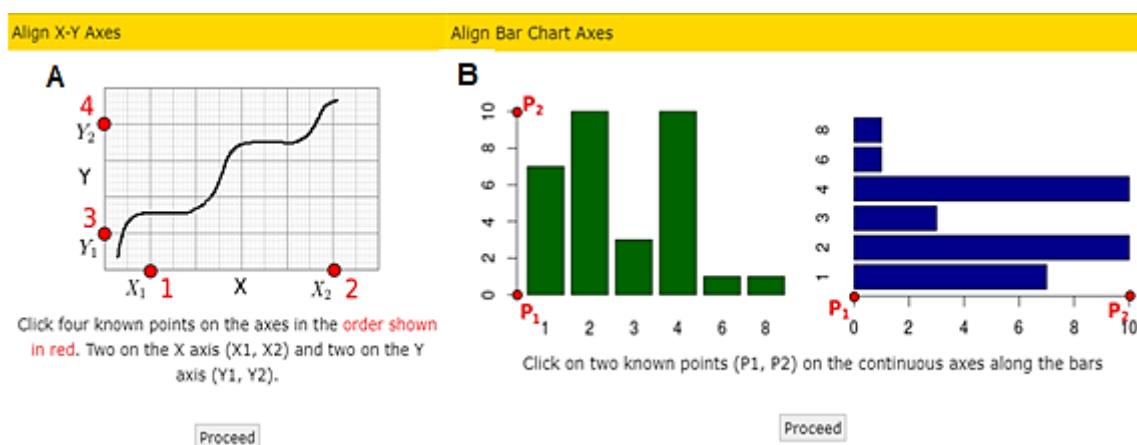


Figura 11: Modos de calibração de eixos de gráficos no WebPlotDigitizer.

Alinhamento dos eixos X e Y conforme o tipo de gráfico. Em A, a calibração é mais adequada para gráficos de linhas, enquanto que em B, para gráficos de barras. Em A, deve-se selecionar com o cursor do *mouse* dois pontos nos eixos das ordenadas e dois no das abscissas. Em B, apenas dois pontos necessitam ser marcados no eixo que se deseja avaliar. Fonte: <<https://apps.automeris.io/wpd/>> Acesso 17 jan. 2021

Bar Chart Calibration

Enter the values at the two points selected on the continuous axes along the bars

Point 1 Point 2 Log Scale

Rotated axes (not exactly vertical or horizontal)

Figura 12: Exemplo de atribuição de valores após a calibração para gráfico de barras

Depois de identificar onde estão os eixos X e Y, como mostrado na figura 11, deve-se atribuir valores a eles, conforme a escala dos gráfico que se está estudando. O exemplo acima usa os valores 0 e 1, mas qualquer número pode ser inserido, conforme as necessidades de cada usuário. Fonte: <<https://apps.automeris.io/wpd/>> Acesso 17 jan. 2021

Os dados foram extraídos em forma de tabelas. Nestas foram incluídas as características gerais dos estudos: o autor e ano de publicação; as linhagens dos animais e seus *backgrounds* genéticos visando se caracterizar melhor as células ou tecidos; as idades, sexos e pesos dos animais; as cepas e DTUs de *T. cruzi*; os inóculos e/ou MOIs (*multiplicity of infection*); os tecidos, órgãos ou tipos celulares analisados; as técnicas avaliadas; os grupos controles, experimentais e seus respectivos n-amostrais, médias, desvios-padrões das médias (SD) e erros-padrões das médias (SEM).

A construção dessas tabelas se baseou no *Systematic Review Protocol for Animal Intervention Studies*, versão 2.0 de dezembro de 2014, desenvolvido pelo *Systematic Review Center for Laboratory animal Experimentation* (SYRCLE), *Radboud University Medical Center* (Radboud umc, Holanda).

7.5 Meta-análise: medidas e modelos

Buscou-se agrupar os resultados extraídos de cada artigo em outras tabelas a partir da identificação de similaridades que favoreceriam a síntese da evidência científica por meio de meta-análise. Desse modo os estudos foram primeiramente reunidos conforme as técnicas utilizadas para a avaliação da multiplicação intracelular das amastigotas de *T. cruzi*. Isso foi feito porque não se julgou o mais adequado a mistura de métodos distintos, não comparáveis diretamente em uma

única análise. Extraíram-se as médias de cada dado presente nos artigos. Quando disponíveis apenas os desvios-padrões (SD) ou erros padrões (SEM), eles foram calculados manualmente ou pelo software Microsoft Excel 2010, com o auxílio dos N amostrais obtidos de cada experimento. No entanto, foi também realizada a análise de todos os dados, com diferentes metodologias em conjunto, com fim de comparação com os resultados individuais.

A obtenção dos n -amostrais para a meta-análise foi baseada em Lazic; Clarke-Williams & Munafò (2018). Dessa maneira, nos estudos moleculares e histológicos se utilizou o n amostral como sendo idêntico ao do número de animais utilizados para cada ensaio, em vez de número de secções histológicas ou campos de microscopia, por exemplo. Nos dados referentes a culturas de células, utilizou-se como n amostral o número de repetições de cada experimento. Isso foi feito com o objetivo de não se superestimar os efeitos dos estudos, obtendo-se dados mais próximos dos reais.

Os dados foram analisados no software *Review Manager (RevMan)*, Windows, versão 5.4.1, The Cochrane Collaboration, 2020, em modo de revisão não-Cochrane, adequado para revisões distintas das realizadas pela instituição.

De modo ideal, assim como outros critérios para a condução das revisões sistemáticas e meta-análises, o método de análise deve ser definido *a priori*. Devido à heterogeneidade prevista, *a priori*, em nosso protocolo (estudos *in vitro* e *in vivo*), utilizamos o Modelo de Efeitos Aleatórios, que é mais conservador, e o comparamos, *a posteriori*, com o Modelo de Efeitos Fixos, já que, segundo Rodrigues (2010), primeiro não fornece uma estimativa de variância com boa precisão quando o número de estudos na meta-análise é pequeno.

7.5.1 **Medidas de sumarização**

As variáveis obtidas foram em sua maior parte contínuas (exceto para focos parasitários teciduais semiquantitativos) e as medidas de desfecho avaliadas absolutas. Utilizou-se o modelo do inverso da variância e das diferenças de médias padronizadas (*standardized mean difference*, SMD) como ferramentas de comparação estatísticas e o modelo de efeitos aleatórios.

A diferença de médias padronizadas se dá pela fórmula (HARRISON *et al.*, 2017):

$$SMD = \frac{(\text{média do grupo de intervenção}) - (\text{média do grupo controle})}{\text{desvio padrão agrupado das respostas}}$$

Em pesquisa clínica, costuma se relacionar com melhoras nos tratamentos controle *versus* placebo (quadro 1) (FARAONE, 2008):

$$SMD = \frac{(\text{melhora com o novo tratamento}) - (\text{melhora com tratamento comparador [placebo]})}{\text{desvio padrão agrupado das respostas}}$$

A diferença de médias padronizadas se eleva com aumento no numerador e dada precisão das medidas, presente na medida avaliada pelo denominador (FARAONE, 2008).

Quadro 1: Interpretação das diferenças de médias padronizadas (SMD) com base em escala pré-definida

SMD=0	Grupo de tratamento e controle têm efeitos semelhantes
SMD >0 ou SMD <0	Depende da escala de avaliação
Melhora associada a escores altos:	SMD >0: Tratamento é mais eficaz que o grupo controle SMD <0: Tratamento é menos eficaz que o placebo
Melhora associada a escores mais baixos:	SMD >0: Tratamento é menos eficaz que o placebo SMD <0: Tratamento é mais eficaz que o placebo

Fonte: Adaptado de FARAONE, 2008

A medida de efeito geral da intervenção dos estudos é dada por (DEEKS & HIGGINGS, 2010):

$$Z = \frac{\hat{\theta}}{SE(\hat{\theta})}$$

The diagram illustrates the components of the Z-score formula. The numerator, $\hat{\theta}$, is circled and has an arrow pointing to a rectangular box labeled 'SMD'. The denominator, $SE(\hat{\theta})$, is also circled and has an arrow pointing to another rectangular box labeled 'SMD'.

Para mais detalhes acerca das interpretações e cálculos estatísticos feitos pelo *Review Manager* 5.4.1, verificar o APÊNDICE C.

7.6 Gráficos de floresta (*forest plots*)

Os resultados agrupados dos estudos foram exibidos em gráficos de floresta (*forest plots*). A linha central representa a linha de nulidade de efeito, ou seja, onde os tratamentos têm efeitos similares nos grupos controle *versus* experimental. Cada quadrado verde no gráfico representa a diferença de médias padronizadas (SMD) entre os grupos de estudo, suas linhas adjacentes são os intervalos de confiança de 95% dos resultados obtidos.

Os dados experimentais incluídos na revisão avaliaram de modos distintos o estresse oxidativo gerado nas células. Como houve variações nos tipos teciduais, celulares e de cepas parasitárias (o que era previsto, já que se referiam a resultados de pesquisas básicas), o agrupamento foi feito conforme as diferentes técnicas de ensaio presentes nos estudos, sendo elas: moleculares, citológicas ou histológicas.

A avaliação ao longo do tempo, relativas à multiplicação intracelular, foi computada somando-se os diferentes intervalos presentes em cada estudo, de forma que ao final se obteve apenas um único resultado com suas medidas de dispersão correspondentes. Embora os diferentes pontos variem de estudo para estudo, tal fenômeno não foi considerado relevante para a pergunta de pesquisa, já que o nosso objetivo era avaliar se os parasitos teriam uma preferência de replicação por ambientes redutores ou oxidantes e também porque os comportamentos intracelulares variam entre as cepas.

8 RESULTADOS

8.1 Seleção dos estudos recuperados

O processo revisional e de meta-análise seguiu a linha de raciocínio apresentada na figura 12. As referências recuperadas nas buscas feitas aos bancos de dados PubMed e Embase foram agrupadas em um arquivo único e tiveram suas duplicatas, isto é, artigos iguais removidos por meio do programa Mendeley 1. 19. 4. Após remoção das duplicatas, 1095 artigos foram avaliados por “título e resumo”. A maior parte da exclusão nesta etapa do estudo foi feita com base no fato de que no resumo, não havia menção específica de *T. cruzi*, ROS ou envolvia apenas formas de vida extracelulares.

Após esse processo, restaram para análise do texto, 161 artigos. Procedeu-se então a avaliação dos critérios de inclusão e exclusão, focando em aspectos apresentados na metodologia do estudo. Após esta última análise, 26 artigos foram considerados elegíveis. Destes, oito estudos foram selecionados aleatoriamente utilizando-se o programa *True Random Number Service (online)* de geração de números aleatórios.

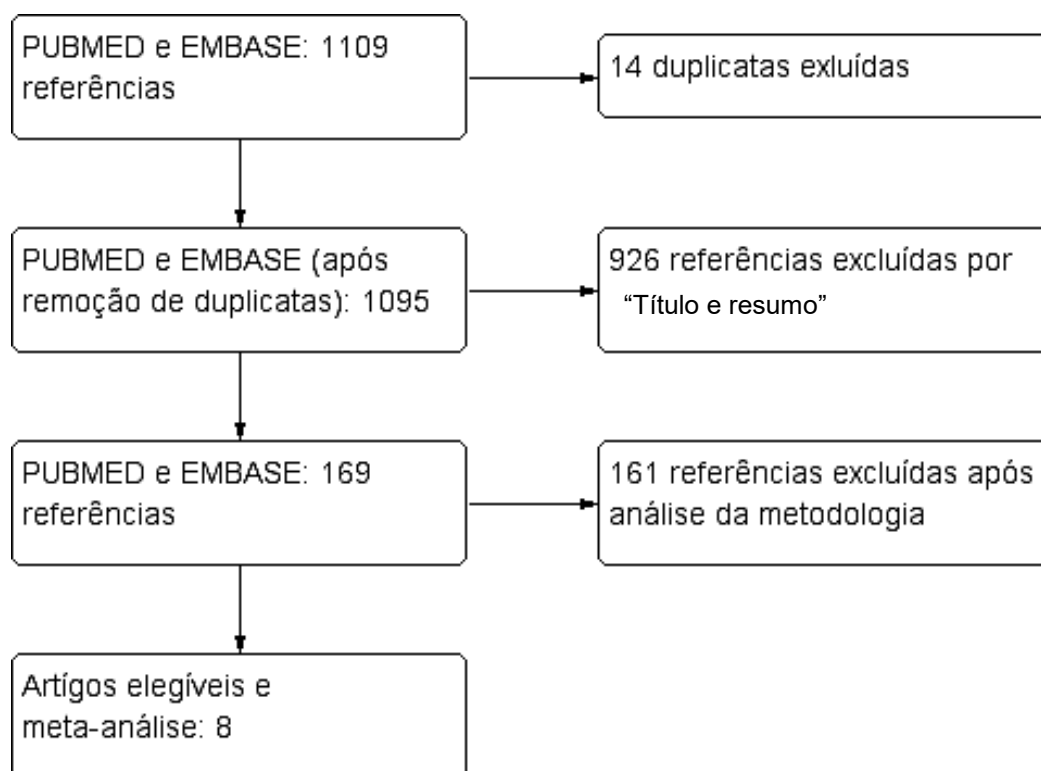


Figura 12: Diagrama do processo de seleção dos estudos.

A figura ilustra o número total de artigos recuperados nas buscas e o número de referências excluídas em cada etapa do processo até a seleção final utilizada para a meta-análise.

8.2 Características dos estudos

Os estudos avaliados nesse trabalho utilizaram dados de animais camundongos e/ou linhagens celulares como modelos experimentais para responderem suas perguntas específicas, sendo que quatro deles usaram a linhagem C57BL/6, três BALB/c e um C3H/HeN. No caso de infecções experimentais em animais ou culturas primárias, a idade dos animais não foi especificada com precisão nos estudos, englobando indivíduos jovens a adultos. O sexo foi explicitado na metade dos artigos e o peso em nenhum deles. Características relativas ao ambiente de vida dos camundongos foram descritas em três trabalhos. Com relação à infecção experimental pelo protozoário *T. cruzi*, destaca-se a preponderância da fase aguda (quadro 2).

Quadro 2: Características dos animais de onde os tecidos ou células foram amostrados

Estudos	Camundongos	Idade	Sexo	Peso	Características descritas para acondicionamento	Fase da infecção
1. Dhiman & Garg 2011.	C3H/HeN	6-8 semanas	Machos	ND	ND	Aguda (25dpi) e crônica (150dpi)
2. Paiva et al. 2012.	C57BL/6	ND	ND	ND	ND	Aguda (até 30dpi)
3. Dhiman & Garg 2014.	C57BL/6 WT e C57BL/6 p47 ^{phox-/-}	8 semanas	ND	ND	ND	Aguda (até 30dpi)
4. Gutierrez et al. 2014.	BALB/c	6-8 semanas	Fêmeas	ND	ND	Aguda (até 20dpi)
5. Barroso et al. 2016.	<i>Pathogen free:</i> C57BL/6 WT; C57BL/6 AhR KO	ND	ND	ND	ND	Aguda (15dpi)
6. Goes et al. 2016.	C57BL/6 WT; C57BL/6 gp91 ^{phox-/-}	4-8 semanas	ND	ND	Acondicionamento padrão com temperatura, umidade, ciclo de luz/escuro controlados. Alimentação com dieta comercial para roedores.	Aguda (até 40dpi)
7. Vilar-Pereira et al. 2016.	BALB/c	5-7 semanas	Fêmeas e machos	ND	Temperatura e umidade controladas (22 ± 2°C; 55 ± 10%), ambiente estéril e alimentação <i>ad libitum</i>	Crônica (até 120dpi)
8. Contreras-Ortiz et al. 2017	BALB/c	4-6 semanas	Fêmeas	ND	Temperatura e umidade controladas (18–23 °C, 50–60%), alimentação controlada.	Aguda (até 60dpi)

Faixa etária dos animais entre: 4-8 semanas foi aceita dentro do critério de inclusão “animais adultos”, pois a maioria dos estudos não determina com precisão a idade dos indivíduos utilizados. ND: não determinado

O quadro 3 resume algumas características das cepas utilizadas por estudo e sus respectivas DTUs. Todas as cepas foram inicialmente isoladas em humanos de fase aguda ou crônica no Brasil, Colômbia ou México.

Quadro 3: Perfil das cepas utilizadas

Cepa	Quantidade de estudo/cepa	Descrição das cepas e hospedeiro
¹ Sylvio X10/4 (DTU I)	2 estudos: Dhiman & Garg, (2011), Dhiman & Garg, (2014)	Isolada por Silveira <i>et al.</i> em 1979 Humano, Pará, Brasil
¹ Colombiana (DTU I)	1 estudo: Vilar-Pereira <i>et al.</i> (2016)	Isolada por Federici, Abelman; Neva em 1964 Humano (crônico), Colômbia
² Ninoa (DTU I)	1 estudo: Contreras-Ortiz <i>et al.</i> (2017)	Isolada em 1979 Humano (agudo). Edo Oaxaca, México
¹ Y (DTU II)	4 estudos: Paiva <i>et al.</i> (2012), Gutierrez <i>et al.</i> (2014), Barroso <i>et al.</i> (2016), Goes <i>et al.</i> (2016)	Isolada por Silva & Nussenzweig, em 1953, Humano (agudo), São Paulo, Brasil

¹Os artigos de Silveira *et al.* (1979); Federici, Abelman; Neva (1964), Silva & Nussenzweig (1953) não tiveram seus textos completos localizados, sendo descritos aqui com base em conhecimentos obtidos por referências indiretas de outros artigos (apud NETO; CAMPOS; HIGAKI, 1974, lista de referências bibliográficas; apud FREITAS *et al.* 2009 lista de referências;). ²Estudada por Monteón; Ramos; Reyes (1993). ³Zingales *et al.* (2009)

O quadro 4 explicita características específicas sobre a metodologia e resultados gerais dos estudos incluídos neste trabalho para análise estatística. Utilizou-se resultados agrupados de células musculares cardíacas, musculares esqueléticas, macrófagos e fibroblastos, tanto primários como de células de linhagens estabelecidas. Em relação aos parasitos, os estudos envolveram as cepas e/ou clones de *T. cruzi*:

Quadro 4: Características das células e de *T. cruzi* utilizados na meta-análise

Estudo	Cepa	Linha-gem de camundongo	Infeção in vivo	Via de inoculação	Tratamento	Infeção <i>in vitro</i>	MOI (parasita : célula) e tempo de infecção	Técnicas	Desfechos gerais em relação às técnicas e tipos celulares apresentados ao lado	Fases aguda ou crônica definidas nos estudos
1. Dhiman & Garg 2011.	Sylvio X10/4	C3H/HeN	1 x 10 ⁴ TCTs C2C12.	IP	1,5mM de apocinina na água (<i>ad libitum</i>)			Real Time-PCR – Tc18SrDNA (25dpi) – Tecidos cardíaco, muscular esquelético	Multiplicação parasitária mais elevada em tecidos de animais tratados com apocinina (inibidor de NADPH oxidase)	Aguda (25dpi) e crônica (150dpi)
2. Paiva et al. 2012.	Y	C57BL/6	1 x 10 ⁴ tripos sanguíneos	IP	<i>In vivo:</i> 1-8 dpi/2-10 dpi (5mg/kg), IP: CoPP; SnPP; apocinina; apoferritina <i>In vitro</i> (48h de tratamento): CoPP (20µM, 50µM), SnPP (50µM), biliverdina (50µM), bilirrubina (10µM), resveratrol (50µM), pterostilbeno (50µM), sulforafano (2µM), oltipraz (75µM), mL-6 (50ng/mL), FeSO ₄ (100 µM, fonte de Fe ²⁺), paraquat (10-100µM), PMA	Infeção com TCTs de LLC-MK ₂ em macrófagos: peritoneais, THP1-diferencia-dos e fibroblastos L929	Macró-fagos: 3:1 Fibroblas -tos: 10:1 /12h	Parasitas/campo; ninhos de amastigotas/seção, Amastigotas/células infectadas Porcentagem de células infectadas (em paralelo com o amastigote burden, por isso usaram porcentagem de céls. infectadas 48hpi) Macrófagos peritoneais, THP-1, fibroblastos L929	8dpi: Maiores números de ninhos de amastigotas em tecido cardíaco de animais tratados com SnPP, números similares aos do controle em tecidos musculares. 15dpi: mais parasitos /campo nesses tecidos, exceto no grupo tratado com CoPP. Número similar de amastigotas em fibroblastos L929, em cultura no grupo controle infectado não tratado vs Infectado CoPP. Em macrófagos, há um favorecimento do grupo SnPP.	Aguda (até 30dpi)

				(200ng/mL), apocinina (1mM), N-acetilcisteína (10µM), SOD- PEG (25U/poço), CAT-PEG (40U/poço), H ₂ O ₂ (100µM)						
3. Dhiman & Garg 2014.	Sylvio X10/4	C57BL/6 (WT p47 ^{phox} KO)	2 x10 ³ ou 1 x10 ⁴ TCTs C2C12	IP				Microscopia óptica de focos parasitários médios (0,7, 14, 21, 30dpi); Real Time-PCR – Tc18SrDNA (30dpi) Tecidos cardíaco e muscular esquelético	Crescimento quase linear dos focos parasitários médios (ninhos de amastigotas dentro das células) entre 0-30dpi grupo de tecidos de animais p47 ^{phox} -/- . Tc18SrDNA foi mais elevado em tecidos infectados dos animais KOs do que em WT.	Aguda (até 30dpi)
4. Gutierrez et al. 2014.	Y	BALB/c	1 x 10 ³ tripos sanguíneos	IP	Intraperitoneal com ZnPPIX (5mg/Kg), hemina (5mg/Kg), salina início: 1hpi, final: 20hpi			Parasitos/campo (15dpi, 20dpi) Tecido cardíaco	Maior multiplicação de parasitos em tecidos de animais tratados com hemina, do que com ZnPPIX e não tratados.	Aguda (até 20dpi)
5. Barroso et al. 2016.	Y	C57BL/6 (WT AhR KO)	1 x 10 ³ tripos	IP		TCT de LLC-MK ₂	5:1/4h	Microscopia óptica (4hpi e 48hpi) qPCR – Tc18S (10dpi e 15dpi) Tecido cardíaco; macrófagos peritoneais	Multiplicação parasitária maior em macrófagos peritoneais de animais WT do que AhR KOs. Produção de ROS mais elevada em macrófagos WT estimulados (<i>zymosan</i> , <i>T. cruzi</i>) do que em KOs. Maior carga parasitária em tecidos cardíacos (10dpi) em WT, mas não significativamente distinta em 15dpi. Inflamação cardíaca e fibrose menores em AhR KO (15dpi).	Aguda (15dpi)
6. Goes et al. 2016.	Y	C57BL/6 (WT)				Infecção de macrófagos	5:1/2h	Parasitos/macrófago (2hpi e 48hpi)	Multiplicação da cepa Y foi mais pronunciada em	Aguda (até 40dpi)

		Phox KO)			peritoneais (após estímulo pelo tioglicolato) por tripos.	Macrófagos peritoneais <i>in vivo</i> ativados com tioglicolato	macrófagos WT do que em gp91 ^{phox-/-} (2hpi-48dpi), assim como a liberação de parasitos no sobrenadante das culturas (6-7dpi).	
7. Vilar-Pereira et al. 2016.	Colombiana	BALB/c	1 x 10 ² tripos. sanguíneos	IP	Intraperitoneal com 15mg/kg de trans-resveratrol (10% etanol/PBS), veículo (10% etanol/PBS) (60dpi-90dpi)	qPCR: TcS18/GAPDH (90dpi) Tecido cardíaco	Maior presença de material genético do parasito em grupo tratado com veículo do que no grupo dos animais tratados com resveratrol.	Crônica (até 120dpi)
8. Contreras-Ortiz et al. 2017	Ninoa	BALB/c	10 tripos.	IP	Oral e diária a partir de 12 dpi: 60µL Astaxantina: 10mg/kg/dia; Nifurtimox: 100mg/kg/dia	Contagem de ninhos de amastigotas (60dpi) Tecido cardíaco	Maior número de ninhos de amastigotas em tecidos de animais não tratados, do que tratados com astaxantina e nifurtimox (60dpi).	Aguda (até 60dpi)

Legenda: TCT: tripomastigotas de culturas celulares, tripo(s): tripomastigotas (s), IP: intraperitoneal. Alguns dados referentes às dosagens não estavam disponíveis não tendo sido reportados por essa razão.

8.2.1 **Ambiente intracelular: normal versus antioxidante**

As primeiras análises foram realizadas utilizando-se dados de experimentos em que houve tratamento ou condições antioxidantes em relação ao grupo considerado “normal” (não tratado ou sem a influência de condições antioxidantes). Ressalta-se que, baseado em dados da literatura demonstrando que a infecção por *T. cruzi* leva a produção de ROS (CARDONI; ROTTEMBERG, SEGURA, 1990; BORGES *et al.* 1992; MELO *et al.* 2003; WEN *et al.* 2010; dos SANTOS *et al.* 2020), é provável que o grupo considerado normal, nesse caso, seja um ambiente oxidante.

8.2.1.1 RT-PCR/qPCR

Analisando-se os dados de RT/PCR ou qPCR, presente nos trabalhos selecionados, foi possível observar uma tendência de aumento da multiplicação intracelular do *T. cruzi* em ambientes antioxidantes (figura 13A; tabela A – APÊNDICE A). No entanto, como o intervalo de confiança da estimativa geral toca a linha de nulidade, não se pode afirmar que houve diferenças entre os grupos. Além disso, o valor de $P=0,10$, não indica diferenças estatisticamente significativas entre os grupos infectado não tratado e infectado tratado. Pelos estudos de Dhiman & Garg (2011) e (2014), a cepa Sylvio X10/4 (DTU I) parece se beneficiar mais de locais menos oxidantes para sua proliferação ou permanência. Por outro lado, a cepa Colombiana, também pertencente à DTU I (Vilar-Pereira *et al.*, 2016) mostrou maior crescimento em ambientes “normais”. A cepa Y, pertencente à DTU II (Barroso *et al.*, 2016), por sua vez, não apresentou diferença entre ambientes mais ou menos oxidantes, aproximando-se mais da linha de nulidade.

Com o objetivo de verificar a contribuição isolada de cada um desses estudos para o resultado final da meta-análise, foi realizada uma análise de sensibilidade com esses dados (figura 13B, tabelas B, C, D, E – APÊNDICE A), em que um estudo por vez foi removido para a avaliação estatística.

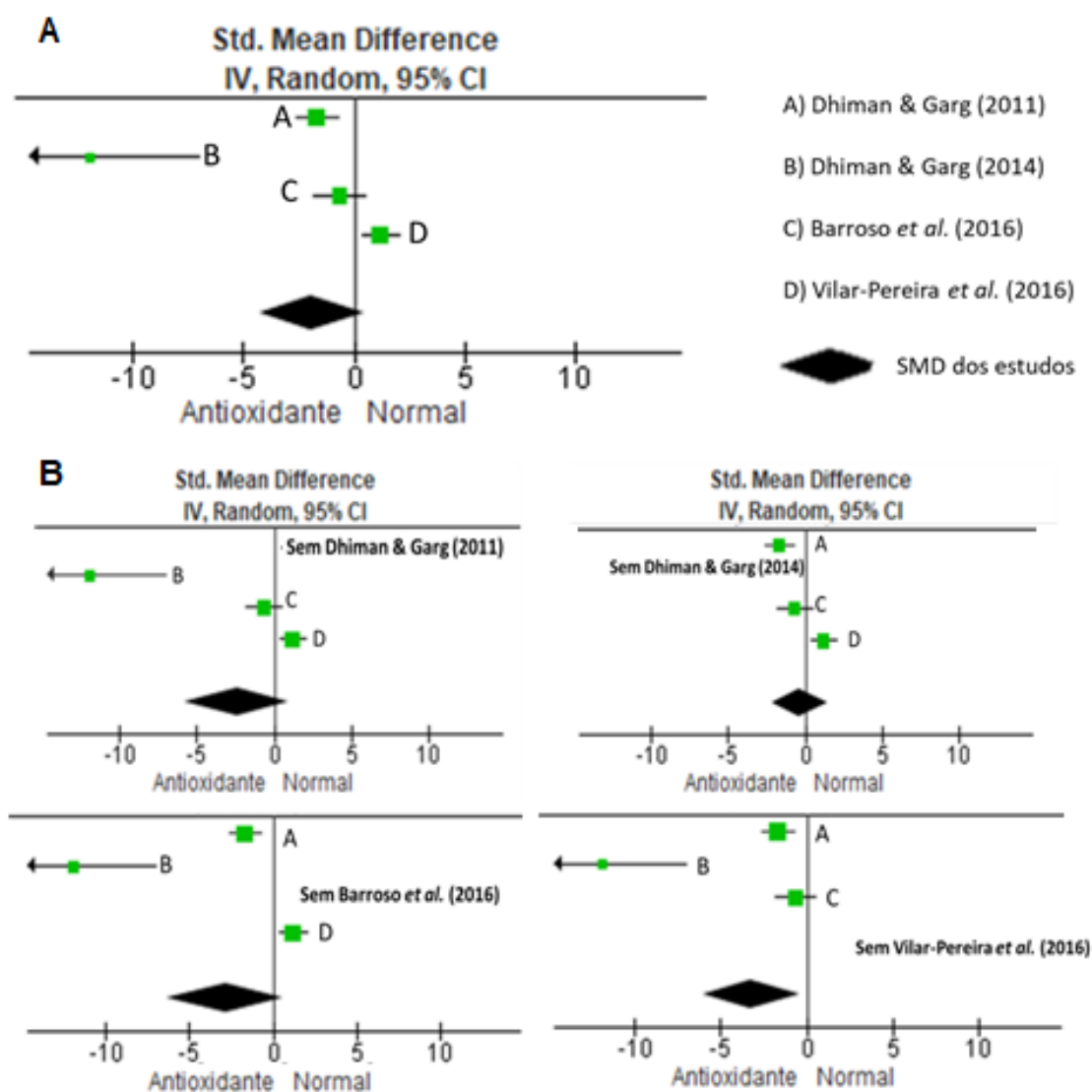


Figura 13: Técnicas moleculares em ambientes normal e antioxidante.

A) Meta-análise de técnicas de RT-PCR/qPCR. B) Análise de sensibilidade por estudo. Em verde: diferenças de médias padronizadas de cada estudo; linhas pretas: intervalo de confiança de 95%; losango: síntese da evidência, a largura do losango representa seu intervalo de confiança de 95%. Legenda: estudos A-B: cepa Sylvio X10/4; estudo C: cepa Y; estudo D: cepa Colombiana.

Novamente, os resultados mostraram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos infectados não tratado e tratado, exceto quando os dados de Vilar-Pereira *et al.* (2016), utilizando a cepa Colombiana (DTU I) foi retirada da análise (figura 13B; tabela E – APÊNDICE A). Após a exclusão dos dados de tal estudo da análise, os resultados mostram um favorecimento do crescimento parasitário em ambientes antioxidantes.

8.2.1.2 Amastigotas/células infectadas e amastigotas /células

Analisando-se a figura 14A (abaixo); tabela F – APÊNDICE A, relativas à multiplicação intracelular de amastigotas por meio de microscopia de luz, observa-se que na avaliação conjunta dos dados houve diferença estatisticamente significativa de aumento de crescimento do parasito em ambiente “normal”. Vale ressaltar que em todos estes trabalhos foi utilizada a cepa Y, representante da DTU II.

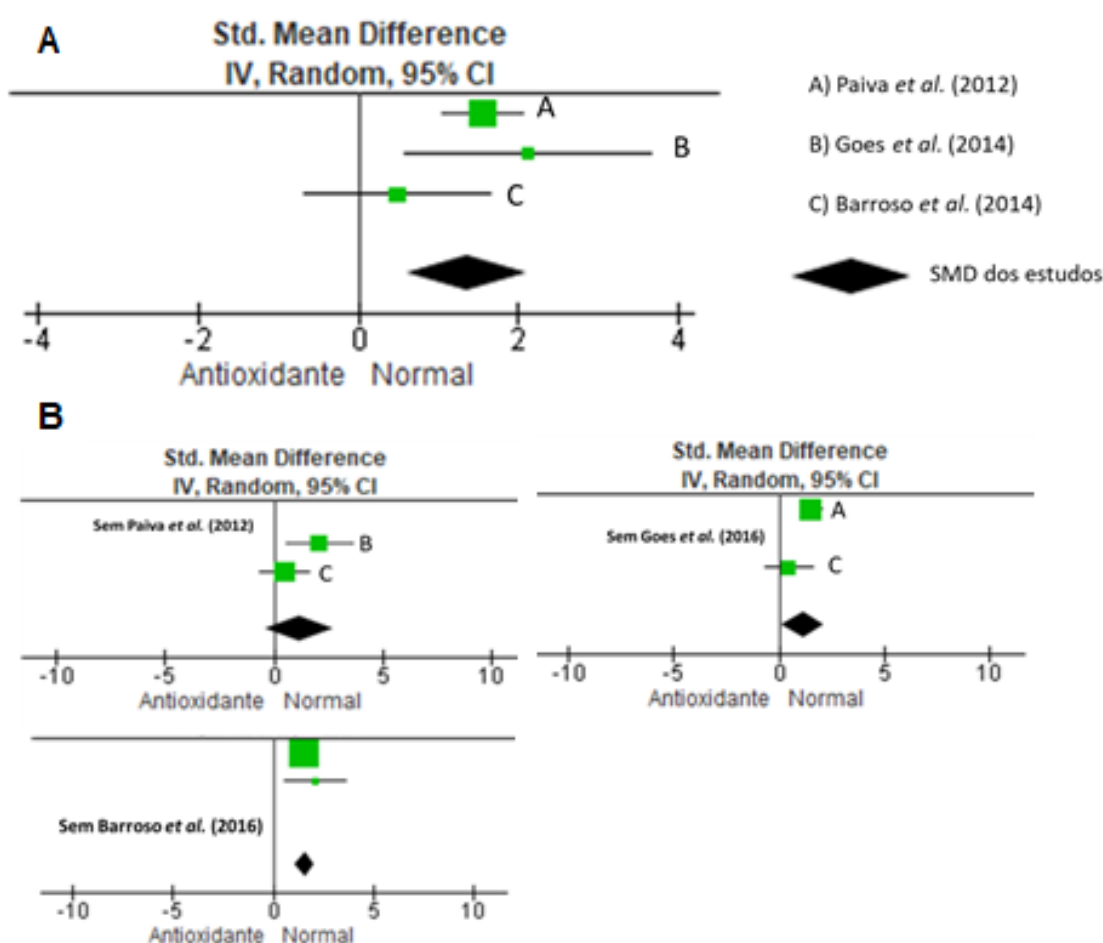


Figura 14: Técnicas citológicas em ambientes normal e antioxidante.

A) Meta-análise de amastigotas/células. B) Análise de sensibilidade por estudo.

Em verde: diferenças de médias padronizadas de cada estudo; linhas pretas: intervalo de confiança de 95%; losango: síntese da evidência, a largura do losango representa seu intervalo de confiança de 95%. Legenda: estudos A-C: cepa Y.

De modo similar ao item anterior (8.2.2.1 – RT-PCR/qPCR), realizou-se uma análise de sensibilidade para se avaliar o peso de cada estudo para a meta-análise. Os artigos foram excluídos um a um para avaliação de mudanças na estimativa de

efeito. Esses dados são mostrados nas tabelas G-I – APÊNDICE A, bem como na figura 14B.

Observou-se que o efeito global não foi alterado com a análise de sensibilidade (figura 14B) quando os trabalhos de Goes *et al.* (2016) ou Barroso *et al.* (2016) foram retirados da análise, indicando que a cepa Y (DTU II) parece preferir ambientes intracelulares menos antioxidantes para se proliferar (figura 14B; tabelas H-I – APÊNDICE A). Ressalta-se, entretanto, que quando Paiva *et al.* (2012) é retirado da análise, a diferença de médias padronizadas dos estudos, representada pelo diamante, toca a linha de nulidade demonstrando a grande contribuição desse trabalho para o resultado geral (figura 14B; tabela G – APÊNDICE A)

8.2.2 **Focos parasitários teciduais**

O agrupamento de dados relativos aos focos parasitários teciduais, ou seja, ninhos de amastigotas/tecido, pseudocistos/campo; parasitos/campo, ninhos de amastigotas/secção, mostram que, considerados todos os trabalhos, não há diferenças estatisticamente significativas de crescimento parasitário em ambientes mais ou menos antioxidantes. Nessa avaliação foi possível também observar que não houve congruência quanto ao crescimento em ambientes mais ou menos antioxidantes para as cepas da DTU I de *T. cruzi* (figura 15A, tabela J – APÊNDICE A). Por outro lado, a cepa Y (Paiva *et al.*, 2012) mostrou maior número de focos parasitários em ambientes menos antioxidantes.

As análises de sensibilidade indicaram efeitos semelhantes aos anteriormente observados para a meta-análise (tabela J – APÊNDICE A). A remoção de estudos, individualmente, resultou em intervalos de confiança amplos e atravessando a linha de nulidade (figura 15B). Isso indica que as estimativas globais, não se considerando a DTU, podem estar tanto favorecendo tanto o ambiente antioxidante, quanto o normal (figura 15B, tabelas K-N – APÊNDICE A;).

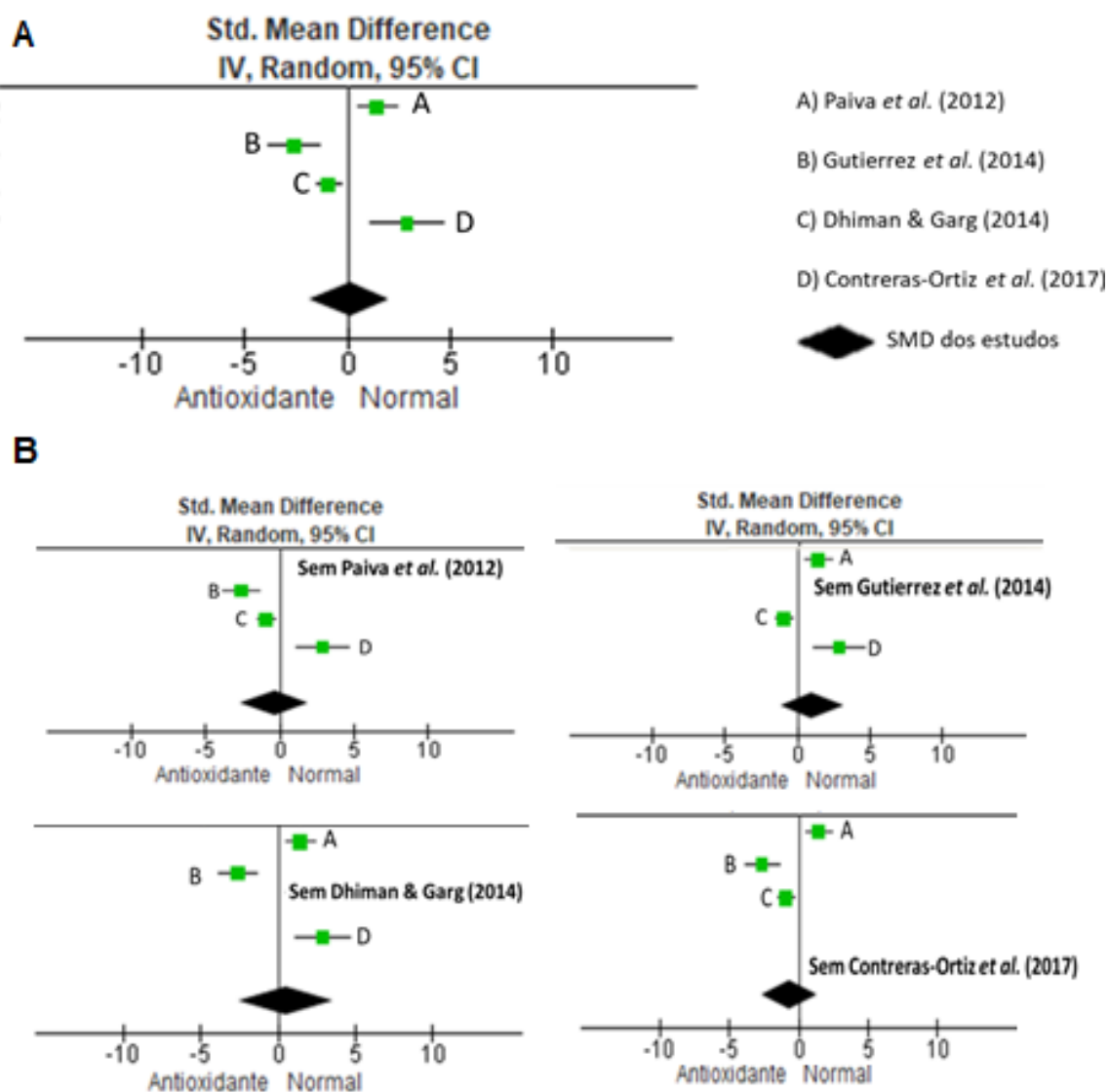


Figura 15: Técnicas histológicas teciduais em ambientes normal e antioxidantes.

A) Meta-análise de focos parasitários teciduais. B) Análise de sensibilidade. Por estudo. Em verde: diferenças de médias padronizadas de cada estudo; linhas pretas: intervalo de confiança de 95%; losango: síntese da evidência, a largura do losango representa seu intervalo de confiança de 95%.
Legenda: estudos A-B: cepa Y; estudo C: Sylvio X10/4; estudo D: cepa Ninoa.

8.2.3 *Ambiente intracelular: normal versus oxidante*

Visando-se verificar se os padrões seriam similares àqueles vistos com os antioxidantes, agrupou-se os dados relativos aos grupos de animais ou células infectados e não tratados e se comparou com aqueles tratados com substâncias, dessa vez, pró-oxidantes (figura 16A). Para essa análise foram utilizados apenas os dados de técnicas histológicas presentes em Paiva *et al.* (2012), Gutierrez *et al.* (2014) e Contreras-Ortiz *et al.* (2014), uma vez que os outros estudos não utilizaram substâncias ou condições pró-oxidantes.

A estimativa de efeito geral indica que não há diferenças de preferências multiplicativas em favor de ambientes normais ou oxidantes, já que o intervalo de confiança toca a linha de nulidade e o valor de $P=0,14$. (tabela O – APÊNDICE A, figura 16A). Aparentemente, existe uma tendência de favorecimento à multiplicação em ambientes menos oxidantes.

Análises de sensibilidade também foram conduzidas e corroboraram o descrito acima, ou seja, favorecimento da multiplicação em ambientes menos oxidantes (figura 16B, tabelas P-R – APÊNDICE A).

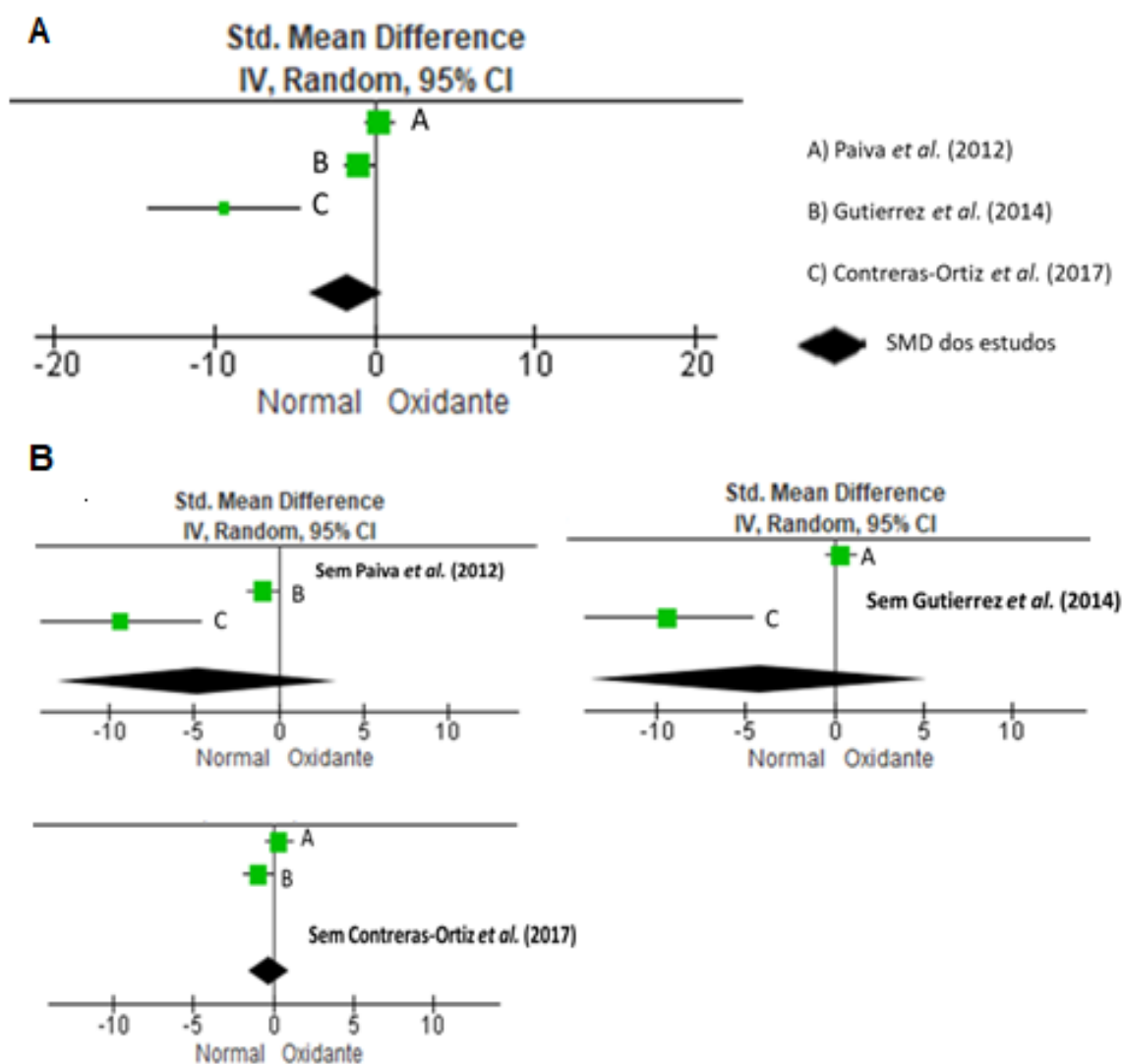


Figura 16: Técnicas histológicas em ambiente intracelular normal vs. oxidante.

A) Meta-análise de focos parasitários. B) Análise de sensibilidade por estudo. Em verde: diferenças de médias padronizadas de cada estudo; linhas pretas: intervalo de confiança de 95%; losango: síntese da evidência, a largura do losango representa seu intervalo de confiança de 95%. Legenda: estudos A-B: cepa Y; estudo C: cepa Ninoa.

8.2.4 Meta-análise de técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Aleatórios

Finalmente, fizemos uma análise levando-se em conta todas as técnicas agrupadas por meio de dois modelos. O primeiro foi o de Efeitos Aleatórios (figura 17) e, como esperado, uma vez que a maior parte dos dados exibiu alta heterogeneidade ($\text{Chi}^2=128,28$, $p<0,00001$; $I^2=92\%$) e não revelou diferenças estatisticamente significativas para ambiente oxidantes ou antioxidantes nos dados anteriores ($Z=0,12$, $P=0,90$), a estimativa de efeito (diamante) e o intervalo de confiança se sobrepõem à linha de nulidade (figura 17; tabela S – APÊNDICE A).

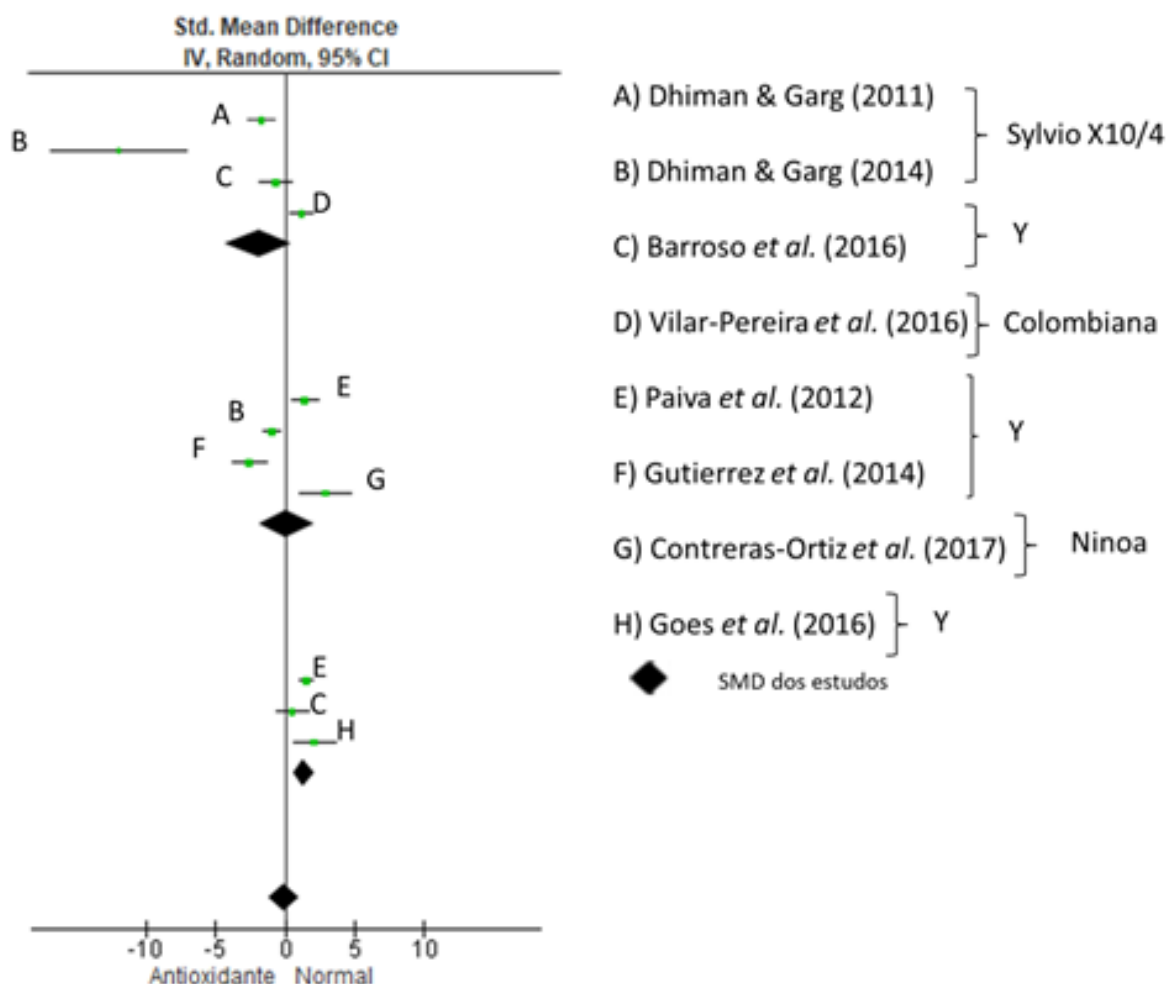


Figura 17: Meta-análise com Modelo de Efeitos Aleatórios: dados globais, agrupamento das diferentes técnicas. Ambiente antioxidante vs. normal.

Em verde: diferenças de médias padronizadas de cada estudo; linhas pretas: intervalo de confiança de 95%; losango: síntese da evidência, a largura do losango representa seu intervalo de confiança de 95%.

8.3 Análise de subgrupos por técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Aleatórios

Foram feitas também análises de subgrupos, definidas *a posteriori*, para a comparação entre técnicas e identificar possíveis fontes de heterogeneidade. Apesar dos estudos serem os mesmos em muitos subgrupos, julgou-se adequado essa comparação, já que as técnicas utilizadas para a avaliação dos desfechos eram distintas a análise dos subgrupos indicou 73,3% de heterogeneidade pelo teste do I^2 .

Para o Modelo de Efeitos Aleatórios retiramos um grupo de técnicas por vez, com o objetivo de avaliar a influência destas para a meta-análise (figuras 18-20; tabelas T-V – APÊNDICE A). Em todos os testes o sumário das estimativas (diamante) toca a linha de nulidade, nota-se uma tendência ao favorecimento de ambiente intracelular, ora normal (figura 18), ora antioxidante (figuras 19-20). Essa análise sugere algumas possíveis fontes de heterogeneidade metodológica presente na meta-análise, embora o baixo número de estudos incluídos tenha sido uma limitação para essa investigação.

A fonte principal observada, relativa à técnica, se dá por aquelas de origem molecular. A heterogeneidade é substancialmente reduzida sem a presença de RT-PCR/qPCR, caindo de $I^2=73,3\%$ (figura 17; tabela S – APÊNDICE A), para $I^2=27,4\%$ entre os subgrupos (figura 18, tabela T– APÊNDICE A).

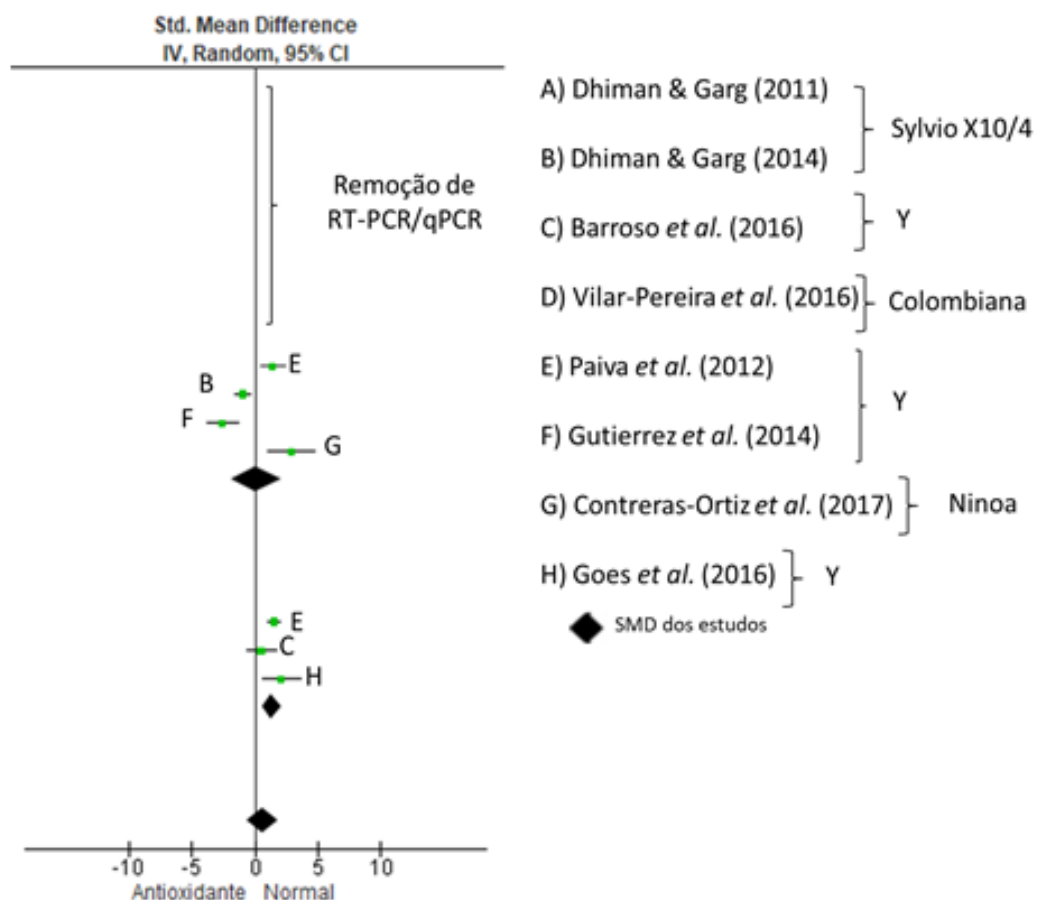


Figura 18: Análise de subgrupos: remoção das técnicas moleculares. Modelo de Efeitos Aleatórios. Ambiente antioxidante vs. normal.

Em verde: diferenças de médias padronizadas de cada estudo; linhas pretas: intervalo de confiança de 95%; losango: síntese da evidência, a largura do losango representa seu intervalo de confiança de 95%.

A remoção das técnicas histológicas não impactou em grande nível na heterogeneidade dos estudos (figura 19, tabela U – APÊNDICE A), a qual permaneceu alta e foi detectada tanto pelo teste de qui-quadrado ($\text{Chi}^2=6,69$, $P=0,010$), quanto pelo do I^2 (85,1%).

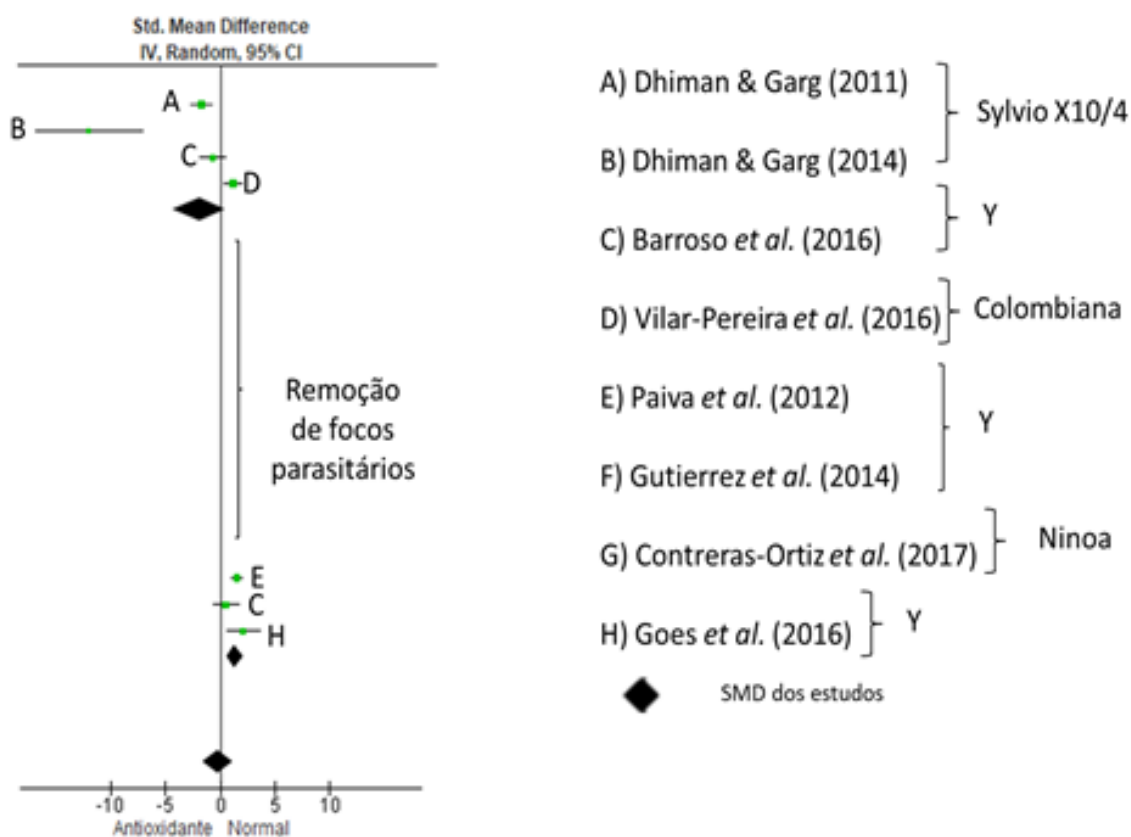


Figura 19: Análise de subgrupos por técnicas: remoção das técnicas histológicas. Modelo de Efeitos Aleatórios. Ambiente antioxidante vs. normal.

Em verde: diferenças de médias padronizadas de cada estudo; linhas pretas: intervalo de confiança de 95%; losango: síntese da evidência, a largura do losango representa seu intervalo de confiança de 95%.

A remoção das técnicas citológicas das análises também refletiu em redução da heterogeneidade figura 20, (tabela V – APÊNDICE A). Assim como aconteceu indicado anteriormente o teste de qui-quadrado não indicou diferenças entre os subgrupos ($\text{Chi}^2=1,71$, $P=0,19$), já o I^2 foi reduzido de 73,3% para 41,6%, com a remoção de amastigotas/células ou células infectadas da análise.

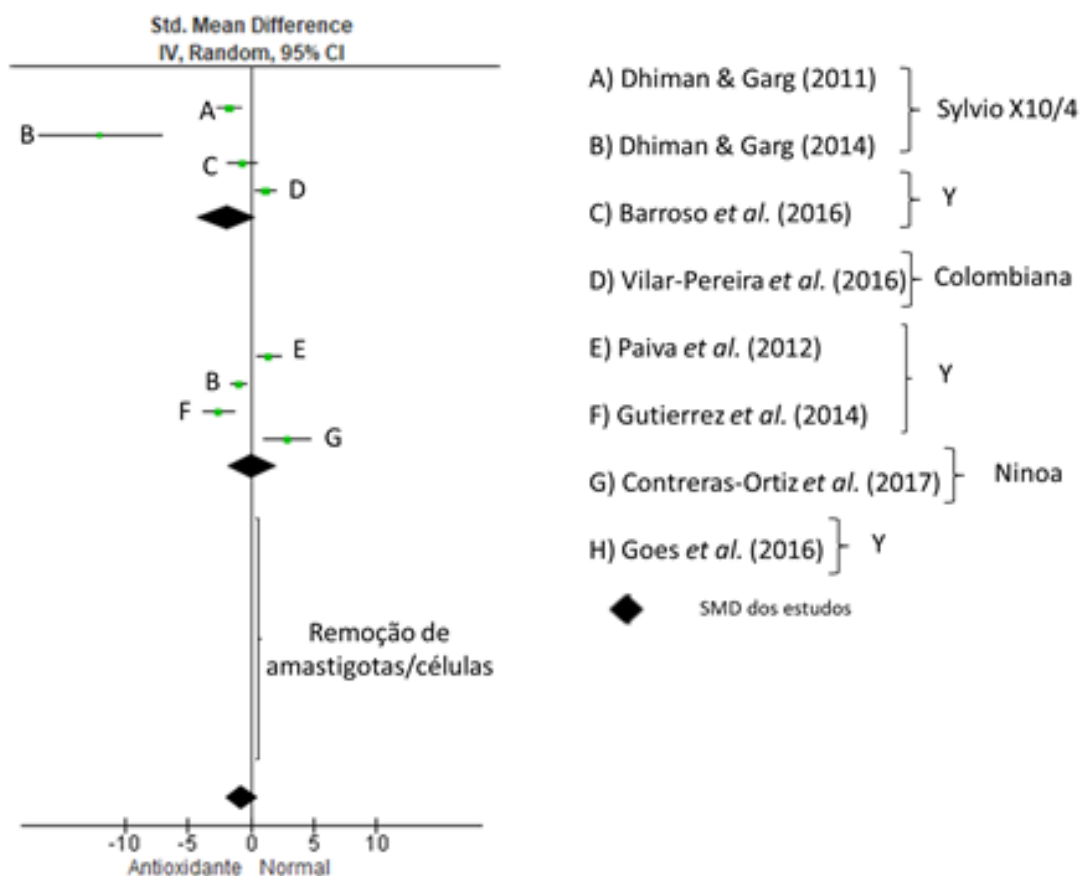


Figura 20: Análise de subgrupos: remoção das técnicas citológicas. Modelo de Efeitos Aleatórios. Ambiente antioxidante vs. normal.

Em verde: diferenças de médias padronizadas de cada estudo; linhas pretas: intervalo de confiança de 95%; losango: síntese da evidência, a largura do losango representa seu intervalo de confiança de 95%.

8.3.1 Meta-análise de técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Fixos

O segundo modelo utilizado, definido *a posteriori*, foi o de Efeitos Fixos (figura 21; tabela W – APÊNDICE A), o qual sugere uma maior multiplicação intracelular em ambiente normal (oxidante), $Z=2,61$, $P=0,009$. Assim como no Modelo de Efeitos Aleatórios, a heterogeneidade é alta, ($\text{Chi}^2=128,28$, $p<0,00001$; $I^2=92\%$). A análise de subgrupos indicou diferenças entre as técnicas estudadas ($\text{Chi}^2=39,01$, $p<0,00001$; $I^2=94,9\%$).

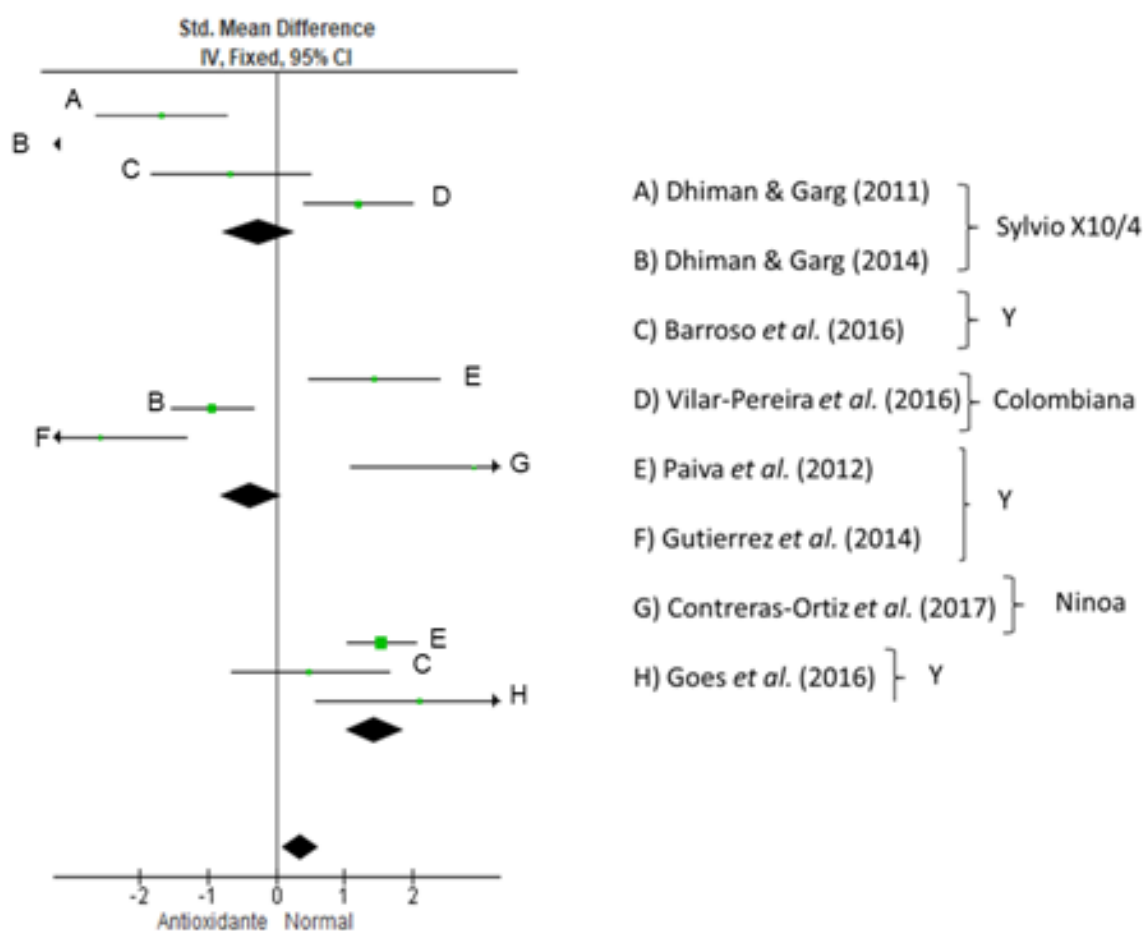


Figura 21: Meta-análise com Modelo de Fixos: dados globais, agrupamento das diferentes técnicas. Ambiente antioxidante vs. normal.

Em verde: diferenças de médias padronizadas de cada estudo; linhas pretas: intervalo de confiança de 95%; losango: síntese da evidência, a largura do losango representa seu intervalo de confiança de 95%; seta sem intervalo de confiança: SMD do estudo está bastante deslocada para a esquerda, além da escala presente no gráfico.

8.3.1.1 Análise de subgrupos por técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Fixos

Assim como realizado no modelo de Efeitos Aleatórios. A análise de subgrupos foi realizada *a posteriori*, removendo-se um grupo de técnicas por vez (figuras 22-24, tabelas X-Z – APÊNDICE A).

A figura 22 e a tabela X – APÊNDICE A mostram a contribuição de RT-PCR/qPCR para a meta-análise, de modo que com sua remoção houve um favorecimento da proliferação intracelular de *T. cruzi* em ambiente mais oxidativo ($Z=3,58$, $P=0,0003$). A análise de subgrupos demonstrou que o $I^2=96,9\%$, permanecendo, portanto, alta.

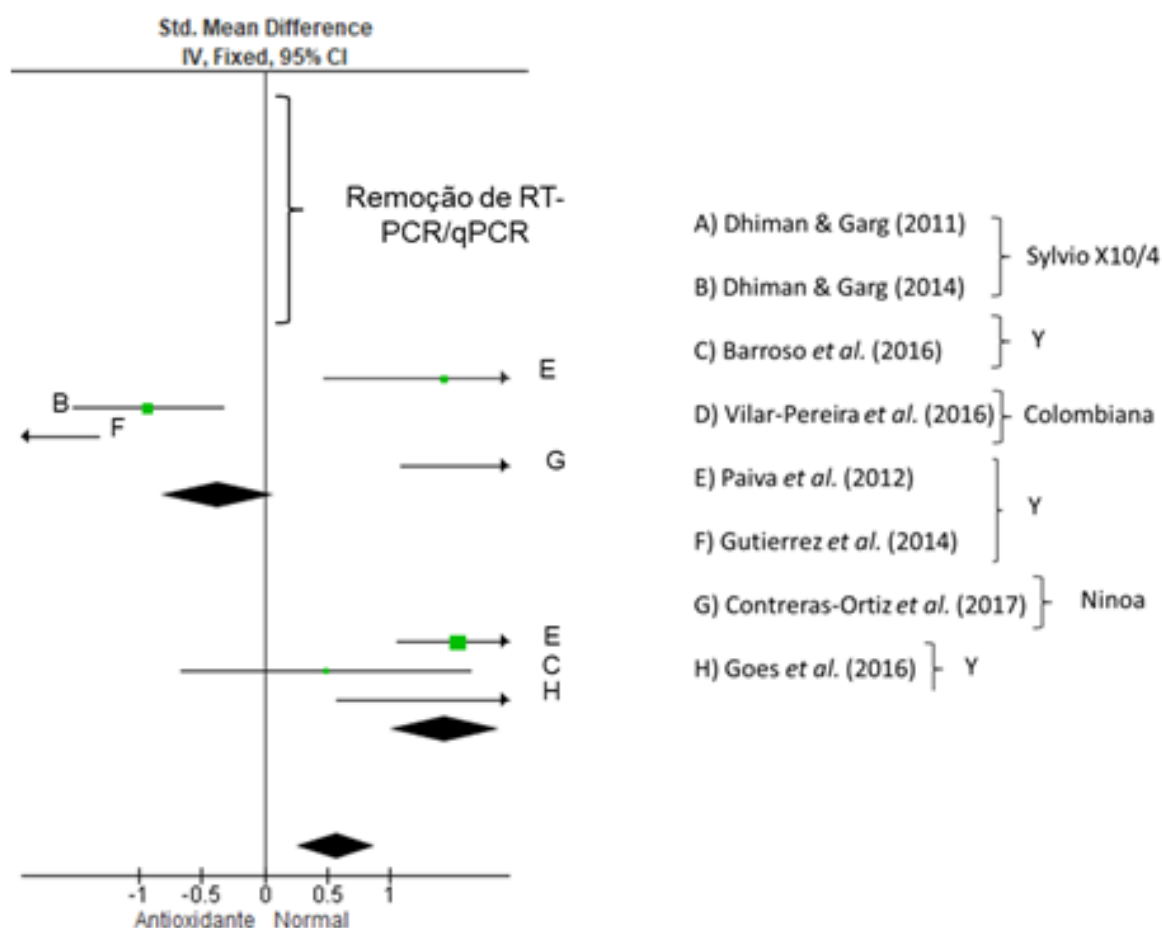


Figura 22: Análise de subgrupos: remoção de técnicas moleculares. Modelo de Fixos. Ambiente antioxidante vs. normal.

Em verde: diferenças de médias padronizadas de cada estudo; linhas pretas: intervalo de confiança de 95%; losango: síntese da evidência, a largura do losango representa seu intervalo de confiança de 95%.

A remoção das técnicas histológicas (figura 23; tabela Y – APÊNDICE A) também mostra um favorecimento do ambiente intracelular normal, em detrimento do antioxidante ($Z=4,45$, $p<0,00001$) e a análise de subgrupos revela heterogeneidade existente entre eles ($\text{Chi}^2=23,44$, $P< 0,00001$; $I^2=95,7\%$).

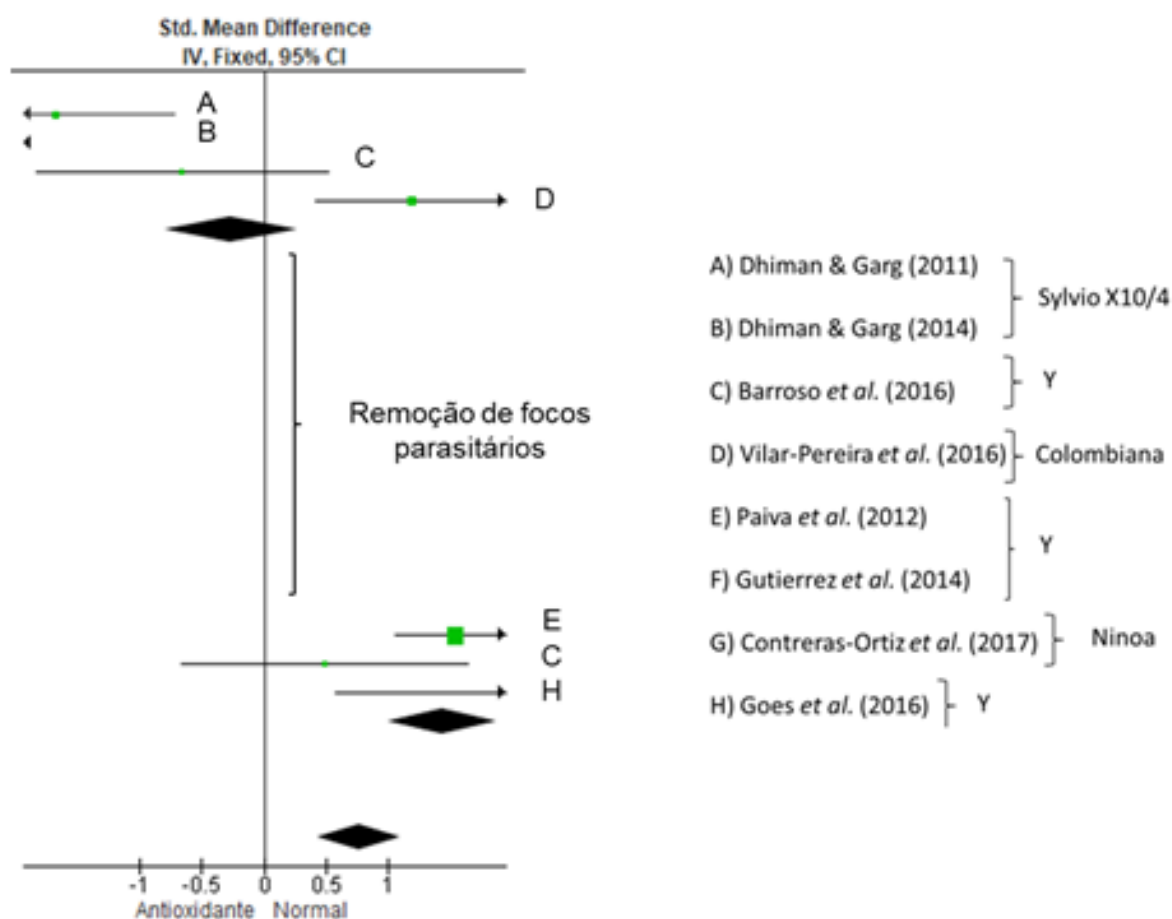


Figura 23: Análise de subgrupos: remoção de técnicas histológicas. Modelo de Fixos. Ambiente antioxidante vs. normal.

Em verde: diferenças de médias padronizadas de cada estudo; linhas pretas: intervalo de confiança de 95%; losango: síntese da evidência, a largura do losango representa seu intervalo de confiança de 95%; seta sem intervalo de confiança: SMD do estudo está bastante deslocada para a esquerda, além da escala presente no gráfico.

Quando as técnicas citológicas são retiradas, observa-se que o diamante toca a linha de nulidade e não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. A análise de subgrupos revela pelos testes de qui-quadrado e do I^2 que não há heterogeneidade entre os grupos restantes, $\text{Chi}^2=0,09$, $P=0,76$; $I^2=0\%$, sugerindo que a fonte de heterogeneidade principal do estudo se deve ao grupo de amastigotas/células ou células infectadas.

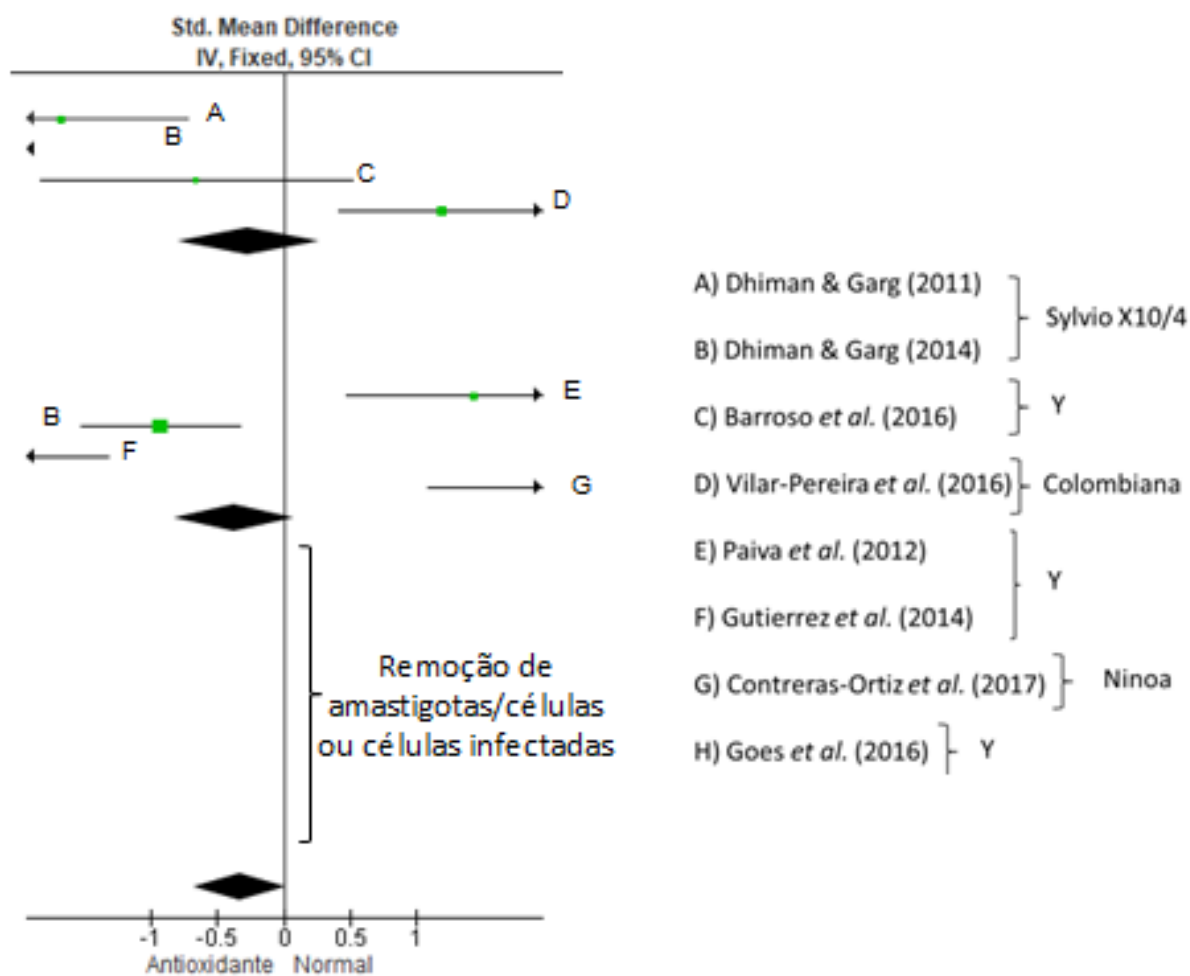


Figura 24: Análise de subgrupos: remoção de técnicas citológicas. Modelo de Fixos. Ambiente antioxidante vs. normal.

Em verde: diferenças de médias padronizadas de cada estudo; linhas pretas: intervalo de confiança de 95%; losango: síntese da evidência, a largura do losango representa seu intervalo de confiança de 95%; seta sem intervalo de confiança: SMD do estudo está bastante deslocada para a esquerda, além da escala presente no gráfico.

9 DISCUSSÃO

Os estudos incluídos e elegíveis para a meta-análise utilizaram diversas linhagens celulares e de camundongos, de sexos distintos e com backgrounds genéticos selvagens ou *knockouts*. Os regimes de utilização de pró ou de antioxidantes e a natureza dos mesmos também foram variados. Isso se refletiu nos dados com heterogeneidade elevada, acima de 90% e possivelmente na não significância estatística entre os grupos tratados/KO e não tratados/WT em termos de proliferação intracelular de *T. cruzi*. Além disso, o número de artigos avaliados estatisticamente foi pequeno e as técnicas utilizadas nos ensaios variadas, o que se soma aos fatos descritos anteriormente. Não há uma padronização de desenhos experimentais entre os estudos de multiplicação intracelular, como por exemplo, a observação dos pontos iniciais e tardios de infecção, como 0h, 24h, 48h, 72h, 96h. Alguns estudos usam pontos fixos, como avaliação da replicação 48h depois da infecção.

Apesar do exposto acima, é notório que, quando analisado o grupo de *T. cruzi* com um todo, independentemente da técnica, em conjunto ou agrupadas, não foi possível observar vantagens para a multiplicação intracelular de *T. cruzi* em ambiente antioxidante ou oxidante. Também não foi possível estabelecer, quando avaliadas em conjunto, um consenso sobre efeitos positivos ou negativos de ambientes antioxidantes ou oxidantes em cada DTU, I ou II, separadamente.

Com relação à DTU I, o grupo com mais representantes nesse estudo, sendo eles: Sylvio X10/4, Colombiana e Ninoa os resultados foram divergentes com relação à resposta de divisão intracelular frente a ambientes mais ou menos oxidantes. Dados de Llewellyn *et al.* (2009), bem como da revisão de Ramírez & Hernández (2018) suportam a diversidade genética dentro do grupo Tc I (DTU I). Os autores evidenciam não só marcadores moleculares distintos, assim como comportamentos biológicos variados, como demonstrado, por curvas de parasitemia, dados de histopatologia e comportamentos ecológicos variados. Ramírez & Hernández (2018) evidenciam ainda que, TcI pode ser agrupado em dois grupos: doméstico e silvestre, conforme sua circulação nos hospedeiros. As cepas pertencentes ao primeiro grupo apresentam, em geral, menor diversidade genética, são encontradas em pacientes de fase crônica e causam menos danos teciduais que aquelas cepas pertencentes ao segundo grupo (RAMÍREZ & HERNÁNDEZ, 2018).

As cepas do grupo silvestre geram níveis mais baixos de parasitemia, porém levam ao desenvolvimento de mais sintomas na fase aguda da infecção e a alterações na homeostase dos tecidos do hospedeiro (RAMÍREZ & HERNANDÉZ, 2018).

Dados de Henrique *et al.* (2016) corroboram a divisão da DTU I nestes dois grupos, uma vez que neste trabalho foi mostrado que as cepas Ninoa e Colombiana isoladas de pacientes nas fases aguda e crônica da infecção (MONTEÓN *et al.*, 1996; FEDERICI, ABELMAN, NEVA., 1964), respectivamente, possuem curvas de parasitemia e expressão de antígenos de superfície diferenciados após a infecção em camundongos Swiss. De acordo com os dados obtidos na presente meta-análise, no entanto, não foi possível agrupar o perfil de crescimento em ambientes pró ou antioxidantes das cepas Sylvio X10/4 e Ninoa, ambas do grupo silvestre dentro da DTU I (SILVEIRA *et al.*, 1979; MONTEÓN *et al.*, 1996). Embora a cepa Colombiana tenha tido maior preferência para ambientes oxidantes (VILAR-PEREIRA *et al.* 2016) e cepa Sylvio X10/4 por ambientes mais antioxidantes (DHIMAN & GARG, 2011, 2014), Ninoa, apresentou maior preferência para ambientes oxidantes (CONTRERAS-ORTIZ, 2017). Destaca-se que dados do nosso grupo mostram que o crescimento intracelular do clone Col1.7G2, derivado da cepa Colombiana, não foi alterado pela ação de agentes antioxidantes (DIAS *et al.* 2017). Segundo Zago *et al.* (2016), as cepas Colombiana e Sylvio X10/4 apresentaram maiores parasitemias, multiplicações intracelulares (Tc18S), escape das células infectadas, expressões aumentadas de enzimas da maquinaria antioxidante e de proteínas do citoesqueleto, associadas à motilidade desses parasitos, além de resistência a desafios com peróxido de hidrogênio e peroxinitrito (*in vitro*) quando comparadas com a cepa TCC (clone cultivado, TcIV). Isso corrobora o perfil cepa-específico dentro da DTU I, em diferentes fases de vida de *T. cruzi*.

Em relação à cepa Y (DTU II), fica claro que essa linhagem de *T. cruzi* parece ter uma replicação intracelular mais favorável em ambientes mais oxidantes, quando a técnica utilizada se referiu à contagem direta de parasitos intracelulares por célula infectada, em ensaios de infecção *in vitro* em cultura celular (PAIVA *et al.*, 2012; GOES *et al.*, 2016; BARROSO *et al.*, 2016). No entanto, quando avaliada a carga parasitária pela técnica de PCR em ensaios de infecção *in vivo* em camundongos (BARROSO *et al.*, 2016), essa cepa mostrou preferência por desenvolvimento em ambientes antioxidantes. Além das diferenças das técnicas utilizadas, essas divergências podem estar relacionadas ao fato de que nas técnicas citológicas

(microscopia de luz) Paiva *et al.* (2012), Goes *et al.* (2016) e Barroso *et al.* (2016) foram analisados, em sua maioria macrófagos, enquanto que em Barroso *et al.* (2016), avaliados por PCR, o tecido utilizado foi o cardíaco. Adicionalmente, no ambiente *in vivo* há a atuação de componentes do sistema imune do hospedeiro, os quais poderiam estar interferindo nesse processo. De qualquer forma, epimastigotas e metacíclicas da cepa Y apresentaram menor virulência e expressão de enzimas antioxidantes da primeira linha de defesa (triparredoxinas peroxidases e tripanotiona sintetase), ou seja, que detoxificam os agentes oxidantes propriamente ditos e não seus produtos de reação, como hidroperóxidos orgânicos, quando comparadas com outras cepas, de DTUs distintas (PIACENZA *et al.*, 2009). Sendo assim, esses produtos secundários poderiam estar sendo utilizados como sinalizadores para o crescimento intracelular do parasito. Alguns autores acreditam que os tipos de espécies reativas influenciam na sua ação sobre a célula, ou seja, processos de sinalização seriam feitos por moléculas de origem primária e o estresse oxidativo, por moléculas secundárias, embora isso não seja um consenso (MOLDOGAZIEVA *et al.*, 2018) e não muito provável. Há ainda dados do nosso grupo que mostram que a cepa JG, outro representante da DTU II, também apresenta maior capacidade replicativa em ambientes intracelulares oxidantes (DIAS *et al.* 2017). Embora esses últimos dados possam sugerir que para a DTU II, ao contrário da DTU I, há uma preferência por desenvolvimento parasitário em ambientes mais oxidantes, seria prematuro fazer essa afirmação baseado em apenas dois representantes (JG e Y) desse grupo.

A meta-análise indica que não há um consenso de preferência de crescimento de *T. cruzi* conforme a cepa ou às DTUs, em relação a características mais redutoras ou oxidantes do ambiente intracelular. Outra hipótese que merece investigação é que esses aspectos podem ser cepa-específicos, em vez de DTU-específicos. Isso aparentemente acontece nas famílias multigênicas de proteínas de superfície de *T. cruzi*, por exemplo (WANG *et al.* 2021).

Possivelmente, as diferenças observadas devam a condições de produção ou não e níveis de ROS gerados no ambiente intracelular, expressão de enzimas antioxidantes pelo parasito e ação do sistema imune do hospedeiro. Além disso, diferentes tipos de agentes oxidantes e redutores foram aplicados nas células e nos animais, os quais têm papéis biológicos e químicos particulares. Sendo assim, mais do que o grupo parasitário ao qual pertence, os níveis de ROS presentes no

ambiente seriam determinantes para influenciar a multiplicação do parasito. O trabalho de Wezena *et al.*(2017), com *Plasmodium falciparum* demonstra que os níveis, tanto de agentes oxidantes (tert-butil hidroperóxido, um hidroperóxido orgânico; H₂O₂; diamida) quanto de antioxidantes (ascorbato, NAC, ditioneitol), poderiam ser prejudiciais para o crescimento parasitário de duas cepas do apicomplexo.

Sobre o processo de descrição dos dados presentes nos artigos, as características dos animais, a alocação dos mesmos, randomização, cegamento dos pesquisadores para os grupos controle e experimental, descrição dos n amostrais por grupo nos experimentos é ausente ou reportada de modo pouco claro, o que poderia tornar os dados dos estudos tendenciosos, afastando-os da realidade (APÊNDICE B). Nas revisões sistemáticas com meta-análises os valores de *p* podem ser usados para se fazer estimativas, quando há falta de dados, mas raramente estes são frequentemente descritos como “*p*<0,05”, o que implica em adaptações e estimativas para o valor de *p* durante a meta-análise. O uso de *p* para os cálculos nesse estudo não foi necessário, porém merece consideração, já que facilitaria para grupos de pesquisa que desejassem fazer outros tipos análises. Outro ponto a ser considerado é o chamado n-amostral e a independência das amostras, conforme recomenda Lazic; Clarke-Williams; Munafò (2018). Os estudos incluídos continham *designs* experimentais que viabilizavam o tratamento de antioxidantes aos animais, por exemplo, junto com a água. Dessa forma, cada camundongo não deveria ser tratado como sendo uma entidade individual. Seria mais adequado considerar a caixa em que eles foram agrupados como uma entidade experimental única nesses casos, mas esse tipo de informação não estava presente. Como este estudo teve como foco análises moleculares, cito e histológicas, esse tipo de dado não precisou ser retirado e computado, mas isso seria importante para não se superestimar os efeitos obtidos, minimizando o risco de viés.

É possível observar, dessa forma, que o número de estudos relacionados à influência dos níveis de ROS no ambiente intracelular para o desenvolvimento de *T. cruzi* ainda é escasso. Ademais, a maior parte dos estudos se concentra em cepas específicas, as quais são utilizadas com mais frequência e são possivelmente mais fáceis de serem cultivadas em laboratório, como por exemplo, a cepa Y. Embora a padronização de metodologias não seja possível e talvez nem adequada, pois limitaria de algum modo o alcance das descobertas científicas, seria importante que

se ampliasse o alcance dos estudos com ROS em amastigotas intracelulares de *T. cruzi* para que resultados mais fidedignos possam ser alcançados, auxiliando no desenho de estratégias clínicas mais eficientes no combate à infecção.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A investigação apresentada, embora não experimental, busca o agrupamento da evidência científica em pesquisa básica na doença de Chagas relacionada à interação parasito-hospedeiro. A pesquisa focou nas infecções intracelulares por *T. cruzi* e em condições experimentais oxidativa ou redutoras.

As meta-análises realizadas englobaram um pequeno número de estudos, com alta heterogeneidade, o que dificultou uma conclusão definitiva acerca de como as espécies reativas do oxigênio (ROS) afetam a multiplicação de *T. cruzi*, reforçando a necessidade da geração de mais dados experimentais sobre esse tema. Entretanto, pelos resultados obtidos, que foram variados entre parasitos de mesmo grupo, acreditamos que não há um perfil DTU-específico. Endossamos, portanto, a hipótese de que as características de replicação do protozoário em questão são cepa-específicas com relação à replicação intracelular, tanto em ambientes oxidantes, quanto redutores.

10.1 Limitações da pesquisa

- Apenas um revisor participou do processo de seleção e extração de dados;
- A literatura cinza não foi incluída nesse trabalho;
- Baixo n amostral de estudos na meta-análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, suppl. I, p. 185-187, September, 1999.
- AUFDERHEIDE, A. C. *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 7, p. 2034-2039, February, 2004. DOI: 10.1073/pnas.0307312101
- BÁEZ, A. L. *et al.* Chronic indeterminate phase of Chagas' disease: mitochondrial involvement in infection with two strains. *Parasitology*, v. 140, n. 3, p.414–421, March, 2013. DOI: 10.1017/S0031182012001771
- BARNABÉ, C. *et al.* Reconsideration of the seven discrete typing units within the species *Trypanosoma cruzi*, a new proposal of three reliable mitochondrial clades. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 39, p. 176–186, April, 2016. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.01.029
- BARROSO, A. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor modulates production of cytokines and reactive oxygen species and development of myocarditis during *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*, v. 84, n. 10, p. 3071- 3082, October, 2016. DOI: 10.1128/IAI.00575-16.
- BERN, C. Chagas' disease. *The New England Journal of Medicine*. v. 373, p. 456-466, July, 2015. DOI: 10.1056/NEJMra1410150
- BORGES, M. M. *et al.* Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 87, n. 4, p. 493-502, Oct./Dec., 1992. DOI: 10.1590/S0074-02761992000400006
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Diretrizes Metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2012. 92 p.: il. – (Série A: Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-85-334-1951-3
- BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, V. 59, n. 1, p. 19-26, March, 1965. DOI: 10.1080/00034983.1965.11686277
- BRENER, Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 63, n. 2, p. 215-220, June, 1969. DOI: 10.1080/00034983.1969.11686622
- CARDONI, R. L.; ROTTEMBERG, M. E. SEGURA, E. L. Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Cellular Immunology*, v. 128, n. 1, p. 11-21, June, 1990. DOI: 10.1016/0008-8749(90)90002-9

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159-218, August, 1909. DOI: 10.1590/S0074-02761909000200008

CHAGAS, C. Tripanosomiase americana: forma aguda da molestia. *Memórias do Instituto. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, p. 37-60, 1916. DOI: 10.1590/S0074-02761916000200003

CHATELAIN, E.; SCANDALE, I. Animal models of Chagas disease and their translational value to drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 5, n. 12, p. 1381-1402, August, 2020. DOI: 10.1080/17460441.2020.1806233

CHIURILLO, M. A. *et al.* Different roles of mitochondrial calcium uniporter complex subunits in growth and infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *MBio*, vol. 8, n. 3, e00574-17, May, 2017. DOI: 10.1128/mBio.00574-17

CHMIELOWSKA-BAK, J.; IZBIANSKA, K.; DECKERT, J. Products of lipid, protein and RNA oxidation as signals and regulators of gene expression in plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, n. 405, p. 1-5, June, 2015. DOI: 10.3389/fpls.2015.00405

CONTRERAS-ORTIZ, J. M. E. *et al.* Effects of astaxanthin in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite*, v. 24, n. 17 EDP Sciences, p. 1-11, May, 2017. DOI: 10.1051/parasite/2017018

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto. Oswaldo Cruz*, v. 104, suppl. 1, p. 31-40, July, 2009. DOI: 10.1590/S0074-02762009000900006.

DE SOUZA, W.; BARRIAS, E. May the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* be infective? *Acta Tropica*, v. 212, n. 105688, December, 2020. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105688

DEEKS, J. J.; HIGGINS, J. P. T. Statistical algorithms in Review Manager 5. On behalf of the Statistical Methods Group of The Cochrane Collaboration. August 2010. Disponível em: <<https://training.cochrane.org/handbook/statistical-methods-revman5>> Acesso 24 jan. 2021

DEEKS, J. J.; HIGGINS, J. P. T.; ALTMAN, D. G. (editors). Analysing data and undertaking meta-analyses (Chapter 10). In: HIGGINS, J. P. T. *et al.* (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* version 6.2 (updated February 2021). Cochrane, 2021. Disponível em: <www.training.cochrane.org/handbook> Acesso 15 mar. 2021

DHIMAN, M.; GARG, N. J. NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease. *The Journal of Pathology*, v. 225, n. 4, p 583–596, December, 2011. DOI: 10.1002/path.2975.

DHIMAN, M.; GARG, N. J. P47phox^{-/-} mice are compromised in expansion and activation of CD8⁺ T cells and susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection. *PloS Pathogens*, v. 10, n. 12, e1004516, December, 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004516

DIAS, P. P. *et al.* Cardiomyocyte oxidants production may signal to *T. cruzi* intracellular development. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.11, n. 8, e0005852, August, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005852

DOS SANTOS, G. *et al.* Cyclophilin 19 secreted in the host cell cytosol by *Trypanosoma cruzi* promotes ROS production required for parasite growth. *Cellular Microbiology*, e13295, November, 2020. DOI: 10.1111/cmi.13295

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES *INICIATIVA*=*Iniciativa* Medicamentos para Doenças Negligenciadas. Doença de Chagas: o que é a doença de Chagas? Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>> Acesso 06 dez. 2018

DUTRA, W. O. *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, suppl. 1, p. 208-218, July, 2009. DOI: 10.1590/S0074-02762009000900027

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 59-65, Jan/Feb., 2004. DOI: 10.1590/S0102-86502004000100010.

FARAONE, S. V. Interpreting estimates of treatment effects: implications for managed care. *P&T – Pharmacy & Therapeutics*, v. 33, n. 12, December, 2008. PMID: 19750051 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2730804/>> Acesso 19 jan. 2021

FEDERICI, E.; ABELMANN, W. H.; NEVA, F. A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 13, p.272-80, March, 1964. DOI: 10.4269/ajtmh.1964.13.272.

FREITAS, J. M. *et al.* The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting *Trypanosoma cruzi* strains. *Plos One*, E5113, v. 4, n. 4, April, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0005113

GOES, G. R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* needs a signal provided by reactive oxygen species to infect macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, e0004555, v. 10, n. 4, April, 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004555

GRANT, M. J.; BOOTH, A. A typology of reviews: an analysis of 14 review types and associated methodologies. *Health Information and Libraries Journal*, v. 26, n. 2, p. 91–108, June, 2009.

GUTIERREZ, F. R. S. Haeme oxygenase activity protects the host against excessive cardiac inflammation during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and Infection*, Intitut Pasteur, v. 16 p. 28-39, January, 2014. DOI: 10.1016/j.micinf.2013.10.007

HARRISON, S. *et al.* The albatross plot: a novel graphical tool for presenting results of diversely reported studies in a systematic review. *Research Synthesis Methods*, February, 2017. DOI: 10.1002/jrsm.1239

HENRIQUE, P. M. *et al.* Correlation between the virulence of *T. cruzi* strains, complement regulatory protein expression levels, and the ability to elicit lytic antibody production. *Experimental Parasitology*, v. 170, p. 66-72, November, 2016. DOI: 10.1016/j.exppara.2016.09.001

HERB, M.; SCHRAMM, M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity. *Antioxidants*, v. 10, n. 2, p. 313, February, 2021. DOI: 10.3390/antiox10020313

HIGGINS J. P. T.; GREEN, S. (editors). Identifying and measuring heterogeneity (Chapter 9.5.2). In: HIGGINS J.P.T., GREEN, S. (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. Disponível em: <https://handbook-5-1.cochrane.org/chapter_9/9_5_2_identifying_and_measuring_heterogeneity.htm> Acesso em: 24 jan. 2021

HJØRLAND, B. Evidence-based practice: an analysis based on the philosophy of science. *Journal of the American Society for Information Science and Technology*, v. 62, n. 7, p. 1301-1310, April, 2011. DOI: 10.1002/asi.21523

HOOJIMANS, C. *et al.* SYRCLE's Risk of bias tool for animals studies. *BMC Medical Research Methodology*, v. 14, n. 43, March, 2014. DOI: 10.1186/1471-2288-14-43

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A.L. R. Ecological aspects of *Trypanosoma cruzi*: wild hosts and reservoirs (Chapter 11). In: TELLERIA J.; TIBAYRENC, M. (editors). *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One hundred years of research*. Second edition, Elsevier. ISBN: 978-0-12-801029-7

KHAN, Y. A.; ANDREWS, N. W., MITTRA, B. ROS Regulate differentiation of visceralizing *Leishmania* species into the virulent amastigote form. *Parasitology Open*, v. 4, n. e19, p. 1–10, September, 2018. DOI: 10.1017/pao.2018.15

LACERDA, A. L. Fotografia e valor documentário: o arquivo de Carlos Chagas. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 16, p. 115-138, 2009. DOI: 10.1590/S0104-59702009000500007.

LASSERSON, T. J.; THOMAS, J.; HIGGINS, J. P. T. Starting a review (Chapter 1). In: HIGGINS J.P.T.; THOMAS, J, CHANDLER, J.; CUMPSTON, M.; LI, T.; PAGE, M.J.; WELCH, V.A. (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.1* (updated September 2020). Cochrane, 2020. Disponível em: <www.training.cochrane.org/handbook> Acesso 14 jan. 2020

LAZIC, S. E.; CLARKE-WILLIAMS, C. J.; MUNAFÒ, M. R. What exactly is 'N' in cell culture and animal experiments? *PLoS Biology*, v. 16, n. 4, e2005282, p. 1-14, April, 2018. DOI: 10.1371/journal.pbio.2005282

LENTINI, G.; PACHECO, N. S.; BURLEIGH, B. A. Targeting host mitochondria: a role for the *Trypanosoma cruzi* amastigote flagellum. *Cellular Microbiology*, v. 20, n. 2, p. e12807, February, 2018. DOI: 10.1111/cmi.12807.

LI, R.; JIA, Z.; TRUSH, M. A. Defining ROS in biology and medicine. *Reactive Oxygen Species (Apex)*, v. 1, n.1, p. 9-21, 2016. DOI: 10.20455/ros.2016.803

- LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. *Frontiers in Public Health*, v. 7, July, 2019. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00166
- LLEWELLYN, M. S. *et al.* Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PloS Pathogens*, v. 5, n. 5, e1000410., May, 2009. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000410
- MACHADO, F. S. *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in Immunopathology*, v. 34, p. 753–770, October, 2012. DOI: 10.1007/s00281-012-0351-7
- MACLEOD, M. R. *et al.* Design of meta-analysis studies (Chapter). In: BESPALOV, A.; MICHEL, M.; STECKLER, T. (editors) Good research practice in non-clinical pharmacology and biomedicine. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 257. 2019 Springer, Cham. ISBN online: 978-3-030-33656-1. DOI: 10.1007/164_2019_289
- MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. Trabalhos científicos (Capítulo 11). In: MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. *Fundamentos da metodologia científica*. 5ª edição. São Paulo: Atlas, 2003.
- MELO, R. C. N. *et al.* Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in vivo. *Cell Biology International*, v. 27, p. 853–861, January, 2003. DOI: 10.1016/S1065-6995(03)00173-2
- MODOGAZIEVA, N. T. *et al.* ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free Radical Research* v. 52, n. 5, p. 507-543, March, 2018. DOI: 10.1080/10715762.2018.1457217
- MÖLLER, M. N. *et al.* Diffusion and transport of reactive species across cell membranes (Chapter 1). In: TROSTCHANSKY, A., RUBBO, H. (editors.). *Bioactive Lipids in Health and Disease*, Advances in experimental medicine and biology, v. 1127, Springer Nature Switzerland AG, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-11488-6_1
- MONTEÓN *et al.* American trypanosomiasis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Experimental Parasitology*, v. 83, p. 267–274, August, 1996. DOI: 10.1006/expr.1996.0074.
- MONTEÓN, V.; RAMOS, A. E.; REYES, P. A. L. Reactividade de sueros de pacientes chagásicos crônicos com extractos de aislamientos mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. (Comunicaciones). *Revista de Biología Tropical*, v. 41, n. 3B, p. 861-865, 1993. Disponível em: <<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/24429/24625>> Acesso 24 mar. 2021
- NETO, V. A.; CAMPOS, R.; HIGAKI, Y. Análise clínica e baseada em exames subsidiários de paciente da qual foi isolada, há vinte e três anos, a cepa “Y” do *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 16, n. 4, p. 238-244, julho-agosto, 1974. CDU 616. 937. 3 – 092.9. Disponível em: <<http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/revista/vol16/238-244.pdf>> Acesso 24 mar. 2021

NORDZIEKE, D.E; MEDRAÑO-FERNANDEZ, I. The plasma membrane: a platform for intra- and intercellular redox signaling. *Antioxidants*, v. 7, n. 168, November , 2018. DOI: 10.3390/antiox7110168

O'ROURKE, K. A Historical perspective on meta-analysis: dealing quantitatively with varying study results. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v. 100, p. 579–582, December, 2007. DOI: 10.1258/jrsm.100.12.579

PAES, M. C. *et al.* The role of heme and reactive oxygen species in proliferation and survival of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology Research*. v. 2011, p. 1-8, 2011. DOI: 10.1155/2011/174614

PAIVA, C. N. *et al.* Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 122, n. 7, p. 2531-2542, July, 2012. DOI: 10.1172/JCI58525.

PAUL, B. D.; SNYDER, S. H. H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, p. 499-507, August, 2012. DOI: 10.1038/nrm3391

PAULA, J. I. O. *et al.* New perspectives for hydrogen peroxide in the amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi in vitro*. *BB–A - Molecular Basis of Disease*, v. 1866, n.12, p. 165951, December, 2020. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.165951

PIACENZA, L. *et al.* Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *International Journal for Parasitology*, v. 39, p. 1455–1464, November, 2009. DOI: 10.1016/j.ijpara.2009.05.010

PIACENZA, L. *et al.* Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochemical. Journal.*, v. 403, p. 323–334, April, 2007. DOI: 10.1042/BJ20061281.

PORTAL DE PERIÓDICOS CAPES/MEC (*site*). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Ministério da Educação. Disponível em: <<http://www-periodicos-capes-gov-br.ez1.periodicos.capes.gov.br/index.php?>> Acesso 19 jan. 2020

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet infectious diseases*, v. 1, n. 2, p. 92-100, September, 2001. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00065-2.

RAMÍREZ, J. D; HERNANDEZ, C. *Trypanosoma cruzi* I: towards the need of genetic subdivision?, Part II. *Acta Tropica*, v. 184, p. 53–58, August, 2018. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.05.005

RASSI JR., A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease (Seminar). *Lancet*, v. 375, p. 1388–402, April, 2010; p. 1388–402. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.

RASSI, A *et al.* Clinical phases and forms of Chagas disease (Chapter 28). In: TELLERIA J.; TIBAYRENC, M. (editors). *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One hundred years of research*. Second edition, Elsevier. ISBN: 978-0-12-801029-7

RESEARCHGATE GMBH. (*site*). Desenvolvido por Ijad Madisch; Sören Hofmayer; Horst Fickenscher. 2008-2021. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/>> Acesso 19 jan. 2020

REVIEW MANAGER (REVMAN). Version 5.4.1. *The Cochrane Collaboration*, September, 2020. Disponível em: <<https://training.cochrane.org/online-learning/core-software-cochrane-reviews/revman/revman-5-download>> Acesso 18 jan. 2021

RIBEIRO, J. L. P. Revisão de investigação e Evidência Científica = Research Review and Scientific Evidence. *Psicologia, Saúde & Doenças*, v. 15, n. 3, p. 671- 682, Novembro, 2014. EISS–N - 2182-8407. Sociedade Portuguesa de Psicologia da Saúde – SPPS. DOI: 10.15309/14psd150309

RODRIGUES, C. L. Metanálise: um guia prático. 2010. 53f. Monografia (Obtenção de grau de Bacharel em Estatística) – Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

ROHATGI, A. Web Plot Digitizer (*software online*), version 4.4, Pacifica, California, USA. November, 2020. Disponível em: <<https://automeris.io/WebPlotDigitizer>>

ROMAÑA, C.; MEYER, H. Estudo do ciclo evolutivo de “Schizotrypanum Cruzi” em cultura de tecidos de embrião de galinha. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 37, n. 1, 1942. DOI: 10.1590/S0074-02761942000100003

SCHOCH, C. L. *et al.* NCBI Taxonomy ID: 5693. In: Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020: baaa062. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5693&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f&log_op=lineage_toggle> Acesso 14 jan. 2021

SENA, E. S. *et al.* Systematic Reviews and meta-analysis of preclinical studies: why perform them and how to appraise them critically. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 34, n. 5, p. 737–742, February, 2014. DOI: 10.1038/jcbfm.2014.28

SILVEIRA, F. T *et al.* Nono caso autóctone de doença de chagas registrado no estado do Pará, Brasil. *Hiléia médica*, Belém, v. 1, p.61-62, 1979.

TANAKA, Y.; TANOWITZ, H.; BLOOM, B. Growth of *Trypanosoma cruzi* in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism. *Infection and Immunity*, v. 41, n. 3, p. 1322-1331, Sept., 1983. DOI:10.1128/IAI.41.3.1322-1331.1983

TRUE RANDOM NUMBER SERVICE. Random.org. (*site*) 1998-2021. Disponível em: <<https://www.random.org/>> Acesso 10 fev. 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Biblioteca Prof. Paulo de Carvalho Mattos. *Tipos de Revisão da Literatura*. Botucatu, 2015. Disponível em: <<https://www.fca.unesp.br/Home/Biblioteca/tipos-de-evisao-de-literatura.pdf>> Acesso 07 dez. 2020

VILAR-PEREIRA, G. *et al.* Resveratrol reverses functional Chagas heart disease in mice. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 10, e1005947, p. 1-19, October, 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005947

WANG, W. *et al.* Strain-specific genome evolution in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *PLoS Pathogens*, v. 17, n. 1, e1009254., p.1-30, January, 2021. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009254

WEN, J. J *et al.* Phenyl- α -tert-butyl-nitron and benzonidazole treatment controlled the mitochondrial oxidative stress and evolution of cardiomyopathy in chronic chagasic rats. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 55, n. 22, June, 2010. DOI:10.1016/j.jacc.2010.02.030

WESTENBERGER, S. J. *et al.* Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, v. 171, n. 2, p. 527–543, October, 2005. DOI: 10.1534/genetics.104.038745

WEZENA, C. A. *et al.* Growth inhibitory effects of standard pro- and antioxidants on the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Experimental Parasitology*, v. 180, p. 64-70, September, 2017. DOI:10.1016/j.exppara.2017.02.017

WORLD HEALTH ORGANIZATION =ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. Weekly epidemiological record: Relevé épidémiologique hebdomadaire. Genève. 6 February 2015, 90th year / 6 février 2015, 90e année. Annual subscription / Abonnement annuel, n. 6, 2015, 90, p. 33-44. ISSN 0049-8114.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis): Epidemiology. Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>> Acesso 06 dez. 2018.

ZAGO, M. P. *et al.* TcI Isolates of *Trypanosoma cruzi* exploit the antioxidant network for enhanced intracellular survival in macrophages and virulence in mice. *Infection and Immunity*, v. 84, n. 6, p. 1842-1856, June, 2016. DOI: 10.1128/IAI.00193-16.

ZINGALES, B. *et al.* A New consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p.1051-1054, November, 2009. DOI: 10.1590/S0074-02762009000700021

ZINGALES, B. *et al.* The Revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, p. 240–253, 2012. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.12.009

APÊNDICE A – Tabelas das meta-análises realizadas via *Review Manager*

Abaixo estão representadas as tabelas referentes às meta-análises por técnica e suas respectivas análises de sensibilidade.

a) Técnicas moleculares: RT-PCR/qPCR

Tabela A: Meta-análise de técnicas moleculares em ambientes normal e antioxidante

Study or Subgroup	Infectado não tratado/WT			Infectado tratado/KO			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	29.0%	-1.68 [-2.64, -0.73]
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	13.4%	-11.92 [-16.78, -7.06]
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	28.3%	-0.66 [-1.84, 0.52]
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	29.4%	1.20 [0.41, 2.00]
Total (95% CI)			39			43	100.0%	-1.92 [-4.29, 0.46]

Heterogeneity: Tau² = 4.83; Chi² = 44.20, df = 3 (P < 0.00001); I² = 93%
Test for overall effect: Z = 1.58 (P = 0.11)

a.1) Análises de sensibilidade: técnicas moleculares (RT-PCR/ qPCR)

Tabela B: Análise de sensibilidade por remoção de Dhiman & Garg (2011), técnicas moleculares

Study or Subgroup	Infectado não tratado/WT			Infectado tratado/KO			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	0.0%	-1.68 [-2.64, -0.73]
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	22.0%	-11.92 [-16.78, -7.06]
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	38.5%	-0.66 [-1.84, 0.52]
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	39.5%	1.20 [0.41, 2.00]
Total (95% CI)			27			31	100.0%	-2.40 [-5.77, 0.97]

Heterogeneity: Tau² = 7.32; Chi² = 31.78, df = 2 (P < 0.00001); I² = 94%
Test for overall effect: Z = 1.39 (P = 0.16)

Tabela C: Análise de sensibilidade por remoção de Dhiman & Garg (2014), técnicas moleculares

Study or Subgroup	Infestado não tratado/WT			Infestado tratado/KO			Total	Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total			
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	33.5%	-1.68 [-2.64, -0.73]	
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	0.0%	-11.92 [-16.78, -7.06]	
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	32.0%	-0.66 [-1.84, 0.52]	
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	34.5%	1.20 [0.41, 2.00]	
Total (95% CI)			31			35	100.0%	-0.36 [-2.20, 1.48]	

Heterogeneity: Tau² = 2.38; Chi² = 21.80, df = 2 (P < 0.0001); I² = 91%
 Test for overall effect: Z = 0.38 (P = 0.70)

Tabela D: Análise de sensibilidade por remoção de Barroso et al. (2016), técnicas moleculares

Study or Subgroup	Infestado não tratado/WT			Infestado tratado/KO			Total	Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total			
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	38.6%	-1.68 [-2.64, -0.73]	
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	22.4%	-11.92 [-16.78, -7.06]	
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	0.0%	-0.66 [-1.84, 0.52]	
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	39.0%	1.20 [0.41, 2.00]	
Total (95% CI)			33			37	100.0%	-2.86 [-6.34, 0.63]	

Heterogeneity: Tau² = 7.96; Chi² = 43.65, df = 2 (P < 0.00001); I² = 95%
 Test for overall effect: Z = 1.61 (P = 0.11)

Tabela E: Análise de sensibilidade por remoção de Vilar-Pereira et al. (2016), técnicas moleculares

Study or Subgroup	Infestado não tratado/WT			Infestado tratado/KO			Total	Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total			
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	40.9%	-1.68 [-2.64, -0.73]	
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	19.1%	-11.92 [-16.78, -7.06]	
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	40.0%	-0.66 [-1.84, 0.52]	
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	0.0%	1.20 [0.41, 2.00]	
Total (95% CI)			26			26	100.0%	-3.23 [-6.09, -0.38]	

Heterogeneity: Tau² = 4.95; Chi² = 19.77, df = 2 (P < 0.0001); I² = 90%
 Test for overall effect: Z = 2.22 (P = 0.03)

b) Técnicas citológicas: amastigotas/células infectadas ou amastigotas/células

Tabela F: Meta-análise de técnicas citológicas em ambientes normal e antioxidante

Study or Subgroup	Infectado não tratado/WT			Infectado tratado/KO			Weight	Std. Mean Difference		Year
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		IV, Random, 95% CI		
Paiva et al. 2012	19.6039	7.2203	36	10.0093	5.1804	48	55.4%	1.55 [1.06, 2.04]	2012	
Goes et al. 2016	0.6455	0.3445	6	0.0865	0.0264	6	18.0%	2.11 [0.58, 3.64]	2016	
Barroso et al. 2016	712.8	370.458	6	549.7	219.4207	6	26.6%	0.49 [-0.66, 1.65]	2016	
Total (95% CI)			48			60	100.0%	1.37 [0.62, 2.12]		

Heterogeneity: Tau² = 0.20; Chi² = 3.49, df = 2 (P = 0.17); I² = 43%
 Test for overall effect: Z = 3.59 (P = 0.0003)

b.1) Análise de sensibilidade: técnicas citológicas: amastigotas/células ou células infectadas

Tabela G: Análise de sensibilidade por remoção de Paiva et al. (2012), técnicas citológicas

Study or Subgroup	Infectado não tratado/WT			Infectado tratado/KO			Weight	Std. Mean Difference	
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		IV, Random, 95% CI	
Paiva et al. 2012	19.6039	7.2203	36	10.0093	5.1804	48	0.0%	1.55 [1.06, 2.04]	
Goes et al. 2016	0.6455	0.3445	6	0.0865	0.0264	6	45.0%	2.11 [0.58, 3.64]	
Barroso et al. 2016	712.8	370.458	6	549.7	219.4207	6	55.0%	0.49 [-0.66, 1.65]	
Total (95% CI)			12			12	100.0%	1.22 [-0.35, 2.80]	

Heterogeneity: Tau² = 0.83; Chi² = 2.73, df = 1 (P = 0.10); I² = 63%
 Test for overall effect: Z = 1.52 (P = 0.13)

Tabela H: Análise de sensibilidade por remoção de Goes et al. (2016), técnicas citológicas

Study or Subgroup	Infectado não tratado/WT			Infectado tratado/KO			Weight	Std. Mean Difference	
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		IV, Random, 95% CI	
Paiva et al. 2012	19.6039	7.2203	36	10.0093	5.1804	48	62.8%	1.55 [1.06, 2.04]	
Goes et al. 2016	0.6455	0.3445	6	0.0865	0.0264	6	0.0%	2.11 [0.58, 3.64]	
Barroso et al. 2016	712.8	370.458	6	549.7	219.4207	6	37.2%	0.49 [-0.66, 1.65]	
Total (95% CI)			42			54	100.0%	1.16 [0.16, 2.16]	

Heterogeneity: Tau² = 0.35; Chi² = 2.70, df = 1 (P = 0.10); I² = 63%
 Test for overall effect: Z = 2.27 (P = 0.02)

Tabela I: Análise de sensibilidade por remoção de Barroso *et al.* (2016), técnicas citológicas

Study or Subgroup	Infectado não tratado/WT			Infectado tratado/KO			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		
Paiva <i>et al.</i> 2012	19.6039	7.2203	36	10.0093	5.1804	48	90.6%	1.55 [1.06, 2.04]
Goes <i>et al.</i> 2016	0.6455	0.3445	6	0.0865	0.0264	6	9.4%	2.11 [0.58, 3.64]
Barroso <i>et al.</i> 2016	712.8	370.458	6	549.7	219.4207	6	0.0%	0.49 [-0.66, 1.65]
Total (95% CI)			42			54	100.0%	1.60 [1.13, 2.07]

Heterogeneity: Tau² = 0.00; Chi² = 0.47, df = 1 (P = 0.49); I² = 0%
 Test for overall effect: Z = 6.68 (P < 0.00001)

c) Técnicas histológicas: focos parasitários teciduais**Tabela J: Meta-análise de focos parasitários teciduais em ambientes normal e antioxidantes**

Study or Subgroup	Infectado não tratado/WT			Infectado tratado/KO			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		
Paiva <i>et al.</i> 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	25.9%	1.44 [0.48, 2.40]
Gutierrez <i>et al.</i> 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	24.8%	-2.57 [-3.82, -1.32]
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	27.0%	-0.93 [-1.53, -0.34]
Contreras-Ortiz <i>et al.</i> 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	22.3%	2.90 [1.09, 4.71]
Total (95% CI)			51			51	100.0%	0.13 [-1.80, 2.06]

Heterogeneity: Tau² = 3.51; Chi² = 41.58, df = 3 (P < 0.00001); I² = 93%
 Test for overall effect: Z = 0.13 (P = 0.90)

c.1) Análise de sensibilidade: técnicas histológicas (focos parasitários teciduais)**Tabela K: Análise de sensibilidade por remoção de Paiva *et al.* (2012), técnicas histológicas**

Study or Subgroup	Infectado não tratado/WT			Infectado tratado/KO			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		
Paiva <i>et al.</i> 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	0.0%	1.44 [0.48, 2.40]
Gutierrez <i>et al.</i> 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	33.5%	-2.57 [-3.82, -1.32]
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	36.2%	-0.93 [-1.53, -0.34]
Contreras-Ortiz <i>et al.</i> 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	30.2%	2.90 [1.09, 4.71]
Total (95% CI)			40			40	100.0%	-0.32 [-2.64, 1.99]

Heterogeneity: Tau² = 3.74; Chi² = 23.80, df = 2 (P < 0.00001); I² = 92%
 Test for overall effect: Z = 0.27 (P = 0.78)

Tabela L: Análise de sensibilidade por remoção de Gutierrez et al. (2014), técnicas histológicas

Study or Subgroup	Infectado não tratado/WT			Infectado tratado/KO			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		
Paiva et al. 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	34.5%	1.44 [0.48, 2.40]
Gutierrez et al. 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	0.0%	-2.57 [-3.82, -1.32]
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	36.0%	-0.93 [-1.53, -0.34]
Contreras-Ortiz et al. 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	29.5%	2.90 [1.09, 4.71]
Total (95% CI)			41			41	100.0%	1.02 [-1.16, 3.19]

Heterogeneity: Tau² = 3.34; Chi² = 27.84, df = 2 (P < 0.00001); I² = 93%
Test for overall effect: Z = 0.91 (P = 0.36)

Tabela M: Análise de sensibilidade por remoção de Dhiman & Garg (2014), técnicas histológicas

Study or Subgroup	Infectado não tratado/WT			Infectado tratado/KO			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		
Paiva et al. 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	34.5%	1.44 [0.48, 2.40]
Gutierrez et al. 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	33.7%	-2.57 [-3.82, -1.32]
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	0.0%	-0.93 [-1.53, -0.34]
Contreras-Ortiz et al. 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	31.8%	2.90 [1.09, 4.71]
Total (95% CI)			27			27	100.0%	0.55 [-2.51, 3.61]

Heterogeneity: Tau² = 6.84; Chi² = 33.61, df = 2 (P < 0.00001); I² = 94%
Test for overall effect: Z = 0.35 (P = 0.72)

Tabela N: Análise de sensibilidade por remoção de Contreras-Ortiz et al., (2017), técnicas histológicas

Study or Subgroup	Infectado não tratado/WT			Infectado tratado/KO			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		
Paiva et al. 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	33.4%	1.44 [0.48, 2.40]
Gutierrez et al. 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	31.6%	-2.57 [-3.82, -1.32]
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	35.0%	-0.93 [-1.53, -0.34]
Contreras-Ortiz et al. 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	0.0%	2.90 [1.09, 4.71]
Total (95% CI)			45			45	100.0%	-0.66 [-2.63, 1.31]

Heterogeneity: Tau² = 2.79; Chi² = 28.19, df = 2 (P < 0.00001); I² = 93%
Test for overall effect: Z = 0.66 (P = 0.51)

Tabela O: Meta-análise de focos parasitários teciduais em ambiente intracelular normal vs. oxidante

Study or Subgroup	Infectado tratado/KO			Infectado não tratado/WT			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI	Year
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total			
Paiva et al. 2012	78.995	37.7666	11	64.985	43.6744	11	42.4%	0.33 [-0.51, 1.17]	2012
Gutierrez et al. 2014	7.6305	4.3346	10	11.94	4.41	10	41.8%	-0.94 [-1.88, -0.01]	2014
Contreras-Ortiz et al. 2017	0	2.9241	6	35	3.9	6	15.8%	-9.37 [-14.09, -4.66]	2017
Total (95% CI)			27			27	100.0%	-1.74 [-4.07, 0.59]	

Heterogeneity: Tau² = 3.16; Chi² = 18.11, df = 2 (P = 0.0001); I² = 89%
Test for overall effect: Z = 1.46 (P = 0.14)

Tabela P: Análise de sensibilidade por remoção de Paiva *et al.* (2012), técnicas histológicas (normal vs. oxidante)

Study or Subgroup	Infectado tratado/KO			Infectado não tratado/WT			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		
Paiva <i>et al.</i> 2012	78.995	37.7666	11	64.985	43.6744	11	0.0%	0.33 [-0.51, 1.17]
Gutierrez <i>et al.</i> 2014	7.6305	4.3346	10	11.94	4.41	10	53.9%	-0.94 [-1.88, -0.01]
Contreras-Ortiz <i>et al.</i> 2017	0	2.9241	6	35	3.9	6	46.1%	-9.37 [-14.09, -4.66]
Total (95% CI)			16			16	100.0%	-4.83 [-13.06, 3.41]

Heterogeneity: Tau² = 32.52; Chi² = 11.82, df = 1 (P = 0.0006); I² = 92%
Test for overall effect: Z = 1.15 (P = 0.25)

Tabela Q: Análise de sensibilidade por remoção de Gutierrez *et al.* (2014), técnicas histológicas (normal vs. oxidante)

Study or Subgroup	Infectado tratado/KO			Infectado não tratado/WT			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		
Paiva <i>et al.</i> 2012	78.995	37.7666	11	64.985	43.6744	11	53.0%	0.33 [-0.51, 1.17]
Gutierrez <i>et al.</i> 2014	7.6305	4.3346	10	11.94	4.41	10	0.0%	-0.94 [-1.88, -0.01]
Contreras-Ortiz <i>et al.</i> 2017	0	2.9241	6	35	3.9	6	47.0%	-9.37 [-14.09, -4.66]
Total (95% CI)			17			17	100.0%	-4.23 [-13.73, 5.26]

Heterogeneity: Tau² = 44.09; Chi² = 15.78, df = 1 (P < 0.0001); I² = 94%
Test for overall effect: Z = 0.87 (P = 0.38)

Tabela R: Análise de sensibilidade por remoção de Contreras-Ortiz *et al.* (2017), técnicas histológicas (normal vs. oxidante)

Study or Subgroup	Infectado tratado/KO			Infectado não tratado/WT			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total		
Paiva <i>et al.</i> 2012	78.995	37.7666	11	64.985	43.6744	11	51.3%	0.33 [-0.51, 1.17]
Gutierrez <i>et al.</i> 2014	7.6305	4.3346	10	11.94	4.41	10	48.7%	-0.94 [-1.88, -0.01]
Contreras-Ortiz <i>et al.</i> 2017	0	2.9241	6	35	3.9	6	0.0%	-9.37 [-14.09, -4.66]
Total (95% CI)			21			21	100.0%	-0.29 [-1.54, 0.96]

Heterogeneity: Tau² = 0.61; Chi² = 3.93, df = 1 (P = 0.05); I² = 75%
Test for overall effect: Z = 0.46 (P = 0.65)

d) Tabelas das meta-análises por técnicas agrupadas

A seguir se encontram as tabelas relativas às meta-análises realizadas pelo Modelo de Efeitos Aleatórios e pelo Modelo de Efeitos Fixos no *Review Manager* versão 5.4.1.

d.1) Modelo de Efeitos Aleatórios

Tabela S: Meta-análise com Modelo de Efeitos Aleatórios: dados globais, agrupamento das diferentes técnicas

5.1.1 RT-PCR/qPCR								
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	9.9%	-1.68 [-2.64, -0.73]
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	3.3%	-11.92 [-16.78, -7.06]
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	9.5%	-0.66 [-1.84, 0.52]
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	10.2%	1.20 [0.41, 2.00]
Subtotal (95% CI)			39			43	33.0%	-1.92 [-4.29, 0.46]
Heterogeneity: Tau ² = 4.83; Chi ² = 44.20, df = 3 (P < 0.00001); I ² = 93%								
Test for overall effect: Z = 1.58 (P = 0.11)								
5.1.2 Focos parasitários								
Paiva et al. 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	9.9%	1.44 [0.48, 2.40]
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	10.4%	-0.93 [-1.53, -0.34]
Gutierrez et al. 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	9.4%	-2.57 [-3.82, -1.32]
Contreras-Ortiz et al. 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	8.2%	2.90 [1.09, 4.71]
Subtotal (95% CI)			51			51	38.0%	0.13 [-1.80, 2.06]
Heterogeneity: Tau ² = 3.51; Chi ² = 41.58, df = 3 (P < 0.00001); I ² = 93%								
Test for overall effect: Z = 0.13 (P = 0.90)								
5.1.3 Amastigotas/células								
Paiva et al. 2012	19.6039	7.2203	36	10.0093	5.1804	48	10.6%	1.55 [1.06, 2.04]
Barroso et al. 2016	712.8	370.458	6	549.7	219.4207	6	9.6%	0.49 [-0.66, 1.65]
Goes et al. 2016	0.6455	0.3445	6	0.0865	0.0264	6	8.8%	2.11 [0.58, 3.64]
Subtotal (95% CI)			48			60	29.0%	1.37 [0.62, 2.12]
Heterogeneity: Tau ² = 0.20; Chi ² = 3.49, df = 2 (P = 0.17); I ² = 43%								
Test for overall effect: Z = 3.59 (P = 0.0003)								
Total (95% CI)			138			154	100.0%	-0.07 [-1.13, 1.00]
Heterogeneity: Tau ² = 2.74; Chi ² = 128.28, df = 10 (P < 0.00001); I ² = 92%								
Test for overall effect: Z = 0.12 (P = 0.90)								
Test for subgroup differences: Chi ² = 7.50, df = 2 (P = 0.02), I ² = 73.3%								

Tabela T: Análise de subgrupos, técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Aleatórios. Remoção de técnicas moleculares

Study or Subgroup	Controle			Experimental			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI	Year
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total			
5.1.1 RT-PCR/qPCR									
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	0.0%	-1.68 [-2.64, -0.73]	2011
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	0.0%	-11.92 [-16.78, -7.06]	2014
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	0.0%	-0.66 [-1.84, 0.52]	2016
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	0.0%	1.20 [0.41, 2.00]	2016
Subtotal (95% CI)			0			0		Not estimable	
Heterogeneity: Not applicable									
Test for overall effect: Not applicable									
5.1.2 Focos parasitários									
Paiva et al. 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	14.9%	1.44 [0.48, 2.40]	2012
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	15.7%	-0.93 [-1.53, -0.34]	2014
Gutierrez et al. 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	14.0%	-2.57 [-3.82, -1.32]	2014
Contreras-Ortiz et al. 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	12.1%	2.90 [1.09, 4.71]	2017
Subtotal (95% CI)			51			51	56.7%	0.13 [-1.80, 2.06]	
Heterogeneity: Tau ² = 3.51; Chi ² = 41.58, df = 3 (P < 0.00001); I ² = 93%									
Test for overall effect: Z = 0.13 (P = 0.90)									
5.1.3 Amastigotas/células									
Paiva et al. 2012	19.6039	7.2203	36	10.0093	5.1804	48	15.9%	1.55 [1.06, 2.04]	2012
Barroso et al. 2016	712.8	370.458	6	549.7	219.4207	6	14.3%	0.49 [-0.66, 1.65]	2016
Goes et al. 2016	0.6455	0.3445	6	0.0865	0.0264	6	13.1%	2.11 [0.58, 3.64]	2016
Subtotal (95% CI)			48			60	43.3%	1.37 [0.62, 2.12]	
Heterogeneity: Tau ² = 0.20; Chi ² = 3.49, df = 2 (P = 0.17); I ² = 43%									
Test for overall effect: Z = 3.59 (P = 0.0003)									
Total (95% CI)			99			111	100.0%	0.65 [-0.60, 1.90]	
Heterogeneity: Tau ² = 2.50; Chi ² = 77.11, df = 6 (P < 0.00001); I ² = 92%									
Test for overall effect: Z = 1.02 (P = 0.31)									
Test for subgroup differences: Chi ² = 1.38, df = 1 (P = 0.24), I ² = 27.4%									

Tabela U: Análise de subgrupos, técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Aleatórios. Remoção de técnicas histológicas

Study or Subgroup	Controle			Experimental			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI	Year
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total			
5.1.1 RT-PCR/qPCR									
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	16.0%	-1.68 [-2.64, -0.73]	2011
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	5.4%	-11.92 [-16.78, -7.06]	2014
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	15.4%	-0.66 [-1.84, 0.52]	2016
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	16.5%	1.20 [0.41, 2.00]	2016
Subtotal (95% CI)			39			43	53.3%	-1.92 [-4.29, 0.46]	
Heterogeneity: Tau ² = 4.83; Chi ² = 44.20, df = 3 (P < 0.00001); I ² = 93%									
Test for overall effect: Z = 1.58 (P = 0.11)									
5.1.2 Focos parasitários									
Paiva et al. 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	0.0%	1.44 [0.48, 2.40]	2012
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	0.0%	-0.93 [-1.53, -0.34]	2014
Gutierrez et al. 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	0.0%	-2.57 [-3.82, -1.32]	2014
Contreras-Ortiz et al. 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	0.0%	2.90 [1.09, 4.71]	2017
Subtotal (95% CI)			0			0		Not estimable	
Heterogeneity: Not applicable									
Test for overall effect: Not applicable									
5.1.3 Amastigotas/células									
Paiva et al. 2012	19.6039	7.2203	36	10.0093	5.1804	48	17.0%	1.55 [1.06, 2.04]	2012
Barroso et al. 2016	712.8	370.458	6	549.7	219.4207	6	15.5%	0.49 [-0.66, 1.65]	2016
Goes et al. 2016	0.6455	0.3445	6	0.0865	0.0264	6	14.2%	2.11 [0.58, 3.64]	2016
Subtotal (95% CI)			48			60	46.7%	1.37 [0.62, 2.12]	
Heterogeneity: Tau ² = 0.20; Chi ² = 3.49, df = 2 (P = 0.17); I ² = 43%									
Test for overall effect: Z = 3.59 (P = 0.0003)									
Total (95% CI)			87			103	100.0%	-0.17 [-1.52, 1.18]	
Heterogeneity: Tau ² = 2.72; Chi ² = 71.13, df = 6 (P < 0.00001); I ² = 92%									
Test for overall effect: Z = 0.25 (P = 0.80)									
Test for subgroup differences: Chi ² = 6.69, df = 1 (P = 0.010), I ² = 85.1%									

Tabela V: Análise de subgrupos, técnicas agrupadas: Modelo de Efeitos Aleatórios. Remoção de técnicas citológicas

Study or Subgroup	Controle			Experimental			Weight	Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI	Year
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total			
5.1.1 RT-PCR/qPCR									
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	13.9%	-1.68 [-2.64, -0.73]	2011
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	5.0%	-11.92 [-16.78, -7.06]	2014
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	13.4%	-0.66 [-1.84, 0.52]	2016
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	14.2%	1.20 [0.41, 2.00]	2016
Subtotal (95% CI)			39			43	46.6%	-1.92 [-4.29, 0.46]	
Heterogeneity: Tau ² = 4.83; Chi ² = 44.20, df = 3 (P < 0.00001); I ² = 93%									
Test for overall effect: Z = 1.58 (P = 0.11)									
5.1.2 Focos parasitários									
Paiva et al. 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	13.9%	1.44 [0.48, 2.40]	2012
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	14.5%	-0.93 [-1.53, -0.34]	2014
Gutierrez et al. 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	13.2%	-2.57 [-3.82, -1.32]	2014
Contreras-Ortiz et al. 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	11.7%	2.90 [1.09, 4.71]	2017
Subtotal (95% CI)			51			51	53.4%	0.13 [-1.80, 2.06]	
Heterogeneity: Tau ² = 3.51; Chi ² = 41.58, df = 3 (P < 0.00001); I ² = 93%									
Test for overall effect: Z = 0.13 (P = 0.90)									
5.1.3 Amastigotas/células									
Paiva et al. 2012	19.6039	7.2203	36	10.0093	5.1804	48	0.0%	1.55 [1.06, 2.04]	2012
Barroso et al. 2016	712.8	370.458	6	549.7	219.4207	6	0.0%	0.49 [-0.66, 1.65]	2016
Goes et al. 2016	0.6455	0.3445	6	0.0865	0.0264	6	0.0%	2.11 [0.58, 3.64]	2016
Subtotal (95% CI)			0			0		Not estimable	
Heterogeneity: Not applicable									
Test for overall effect: Not applicable									
Total (95% CI)			90			94	100.0%	-0.69 [-2.02, 0.65]	
Heterogeneity: Tau ² = 3.10; Chi ² = 85.87, df = 7 (P < 0.00001); I ² = 92%									
Test for overall effect: Z = 1.01 (P = 0.31)									
Test for subgroup differences: Chi ² = 1.71, df = 1 (P = 0.19), I ² = 41.6%									

d.2) Modelo de Efeitos Fixos

Tabela W: Meta-análise com Modelo de Fixos: dados globais, agrupamento das diferentes técnicas

Study or Subgroup	Controle			Experimental			Weight	Std. Mean Difference IV, Fixed, 95% CI	Year
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total			
5.1.1 RT-PCR/qPCR									
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	8.1%	-1.68 [-2.64, -0.73]	2011
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	0.3%	-11.92 [-16.78, -7.06]	2014
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	5.3%	-0.66 [-1.84, 0.52]	2016
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	11.8%	1.20 [0.41, 2.00]	2016
Subtotal (95% CI)			39			43	25.5%	-0.26 [-0.80, 0.27]	
Heterogeneity: Chi ² = 44.20, df = 3 (P < 0.00001); I ² = 93%									
Test for overall effect: Z = 0.96 (P = 0.34)									
5.1.2 Focos parasitários									
Paiva et al. 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	8.0%	1.44 [0.48, 2.40]	2012
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	20.6%	-0.93 [-1.53, -0.34]	2014
Gutierrez et al. 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	4.7%	-2.57 [-3.82, -1.32]	2014
Contreras-Ortiz et al. 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	2.2%	2.90 [1.09, 4.71]	2017
Subtotal (95% CI)			51			51	35.6%	-0.37 [-0.83, 0.08]	
Heterogeneity: Chi ² = 41.58, df = 3 (P < 0.00001); I ² = 93%									
Test for overall effect: Z = 1.61 (P = 0.11)									
5.1.3 Amastigotas/células									
Paiva et al. 2012	19.6039	7.2203	36	10.0093	5.1804	48	30.2%	1.55 [1.06, 2.04]	2012
Barroso et al. 2016	712.8	370.458	6	549.7	219.4207	6	5.5%	0.49 [-0.66, 1.65]	2016
Goes et al. 2016	0.6455	0.3445	6	0.0865	0.0264	6	3.2%	2.11 [0.58, 3.64]	2016
Subtotal (95% CI)			48			60	38.9%	1.45 [1.01, 1.88]	
Heterogeneity: Chi ² = 3.49, df = 2 (P = 0.17); I ² = 43%									
Test for overall effect: Z = 6.50 (P < 0.00001)									
Total (95% CI)			138			154	100.0%	0.36 [0.09, 0.63]	
Heterogeneity: Chi ² = 128.28, df = 10 (P < 0.00001); I ² = 92%									
Test for overall effect: Z = 2.61 (P = 0.009)									
Test for subgroup differences: Chi ² = 39.01, df = 2 (P < 0.00001), I ² = 94.9%									

Tabela X: Análise de subgrupos, técnicas agrupadas (Modelo de Efeitos Fixos). Remoção de técnicas moleculares

Study or Subgroup	Controle			Experimental			Weight	Std. Mean Difference IV, Fixed, 95% CI	Year
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total			
5.1.1 RT-PCR/qPCR									
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	0.0%	-1.68 [-2.64, -0.73]	2011
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	0.0%	-11.92 [-16.78, -7.06]	2014
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	0.0%	-0.66 [-1.84, 0.52]	2016
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	0.0%	1.20 [0.41, 2.00]	2016
Subtotal (95% CI)			0			0		Not estimable	
Heterogeneity: Not applicable									
Test for overall effect: Not applicable									
5.1.2 Focos parasitários									
Paiva et al. 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	10.8%	1.44 [0.48, 2.40]	2012
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	27.7%	-0.93 [-1.53, -0.34]	2014
Gutierrez et al. 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	6.3%	-2.57 [-3.82, -1.32]	2014
Contreras-Ortiz et al. 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	3.0%	2.90 [1.09, 4.71]	2017
Subtotal (95% CI)			51			51	47.8%	-0.37 [-0.83, 0.08]	
Heterogeneity: $\text{Chi}^2 = 41.58$, $\text{df} = 3$ ($P < 0.00001$); $I^2 = 93\%$									
Test for overall effect: $Z = 1.61$ ($P = 0.11$)									
5.1.3 Amastigotas/células									
Paiva et al. 2012	19.6039	7.2203	36	10.0093	5.1804	48	40.6%	1.55 [1.06, 2.04]	2012
Barroso et al. 2016	712.8	370.458	6	549.7	219.4207	6	7.4%	0.49 [-0.66, 1.65]	2016
Goes et al. 2016	0.6455	0.3445	6	0.0865	0.0264	6	4.2%	2.11 [0.58, 3.64]	2016
Subtotal (95% CI)			48			60	52.2%	1.45 [1.01, 1.88]	
Heterogeneity: $\text{Chi}^2 = 3.49$, $\text{df} = 2$ ($P = 0.17$); $I^2 = 43\%$									
Test for overall effect: $Z = 6.50$ ($P < 0.00001$)									
Total (95% CI)			99			111	100.0%	0.58 [0.26, 0.89]	
Heterogeneity: $\text{Chi}^2 = 77.11$, $\text{df} = 6$ ($P < 0.00001$); $I^2 = 92\%$									
Test for overall effect: $Z = 3.58$ ($P = 0.0003$)									
Test for subgroup differences: $\text{Chi}^2 = 32.04$, $\text{df} = 1$ ($P < 0.00001$), $I^2 = 96.9\%$									

Tabela Y: Análise de subgrupos, técnicas agrupadas (Modelo de Efeitos Fixos). Remoção de técnicas histológicas

Study or Subgroup	Controle			Experimental			Weight	Std. Mean Difference IV, Fixed, 95% CI	Year
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total			
5.1.1 RT-PCR/qPCR									
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	12.6%	-1.68 [-2.64, -0.73]	2011
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	0.5%	-11.92 [-16.78, -7.06]	2014
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	8.3%	-0.66 [-1.84, 0.52]	2016
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	18.3%	1.20 [0.41, 2.00]	2016
Subtotal (95% CI)			39			43	39.6%	-0.26 [-0.80, 0.27]	
Heterogeneity: Chi ² = 44.20, df = 3 (P < 0.00001); I ² = 93%									
Test for overall effect: Z = 0.96 (P = 0.34)									
5.1.2 Focos parasitários									
Paiva et al. 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	0.0%	1.44 [0.48, 2.40]	2012
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	0.0%	-0.93 [-1.53, -0.34]	2014
Gutierrez et al. 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	0.0%	-2.57 [-3.82, -1.32]	2014
Contreras-Ortiz et al. 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	0.0%	2.90 [1.09, 4.71]	2017
Subtotal (95% CI)			0			0		Not estimable	
Heterogeneity: Not applicable									
Test for overall effect: Not applicable									
5.1.3 Amastigotas/células									
Paiva et al. 2012	19.6039	7.2203	36	10.0093	5.1804	48	46.9%	1.55 [1.06, 2.04]	2012
Barroso et al. 2016	712.8	370.458	6	549.7	219.4207	6	8.6%	0.49 [-0.66, 1.65]	2016
Goes et al. 2016	0.6455	0.3445	6	0.0865	0.0264	6	4.9%	2.11 [0.58, 3.64]	2016
Subtotal (95% CI)			48			60	60.4%	1.45 [1.01, 1.88]	
Heterogeneity: Chi ² = 3.49, df = 2 (P = 0.17); I ² = 43%									
Test for overall effect: Z = 6.50 (P < 0.00001)									
Total (95% CI)			87			103	100.0%	0.77 [0.43, 1.11]	
Heterogeneity: Chi ² = 71.13, df = 6 (P < 0.00001); I ² = 92%									
Test for overall effect: Z = 4.45 (P < 0.00001)									
Test for subgroup differences: Chi ² = 23.44, df = 1 (P < 0.00001), I ² = 95.7%									

Tabela Z: Análise de subgrupos, técnicas agrupadas (Modelo de Efeitos Fixos). Remoção de técnicas citológicas

Study or Subgroup	Controle			Experimental			Weight	Std. Mean Difference IV, Fixed, 95% CI	Year
	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total			
5.1.1 RT-PCR/qPCR									
Dhiman & Garg 2011	230,350	79,311.8586	12	534,950	234,157.8003	12	13.3%	-1.68 [-2.64, -0.73]	2011
Dhiman & Garg, 2014	325.7	31.4	8	1,605	140	8	0.5%	-11.92 [-16.78, -7.06]	2014
Barroso et al. 2016	3,470	2,002.0743	6	4,781.5	1,641.9572	6	8.7%	-0.66 [-1.84, 0.52]	2016
Vilar-Pereira et al. 2016	1.4615	1.6838	13	0.0965	0.0843	17	19.2%	1.20 [0.41, 2.00]	2016
Subtotal (95% CI)			39			43	41.7%	-0.26 [-0.80, 0.27]	
Heterogeneity: $\text{Chi}^2 = 44.20$, $\text{df} = 3$ ($P < 0.00001$); $I^2 = 93\%$ Test for overall effect: $Z = 0.96$ ($P = 0.34$)									
5.1.2 Focos parasitários									
Paiva et al. 2012	64.985	43.6744	11	16.8028	12.73	11	13.1%	1.44 [0.48, 2.40]	2012
Dhiman & Garg, 2014	1.2502	2.0143	24	4.453	4.3256	24	33.7%	-0.93 [-1.53, -0.34]	2014
Gutierrez et al. 2014	11.94	4.41	10	45.805	17.2632	10	7.7%	-2.57 [-3.82, -1.32]	2014
Contreras-Ortiz et al. 2017	35	3.9	6	24	3.05	6	3.7%	2.90 [1.09, 4.71]	2017
Subtotal (95% CI)			51			51	58.3%	-0.37 [-0.83, 0.08]	
Heterogeneity: $\text{Chi}^2 = 41.58$, $\text{df} = 3$ ($P < 0.00001$); $I^2 = 93\%$ Test for overall effect: $Z = 1.61$ ($P = 0.11$)									
5.1.3 Amastigotas/células									
Paiva et al. 2012	19.6039	7.2203	36	10.0093	5.1804	48	0.0%	1.55 [1.06, 2.04]	2012
Barroso et al. 2016	712.8	370.458	6	549.7	219.4207	6	0.0%	0.49 [-0.66, 1.65]	2016
Goes et al. 2016	0.6455	0.3445	6	0.0865	0.0264	6	0.0%	2.11 [0.58, 3.64]	2016
Subtotal (95% CI)			0			0		Not estimable	
Heterogeneity: Not applicable Test for overall effect: Not applicable									
Total (95% CI)			90			94	100.0%	-0.33 [-0.68, 0.02]	
Heterogeneity: $\text{Chi}^2 = 85.87$, $\text{df} = 7$ ($P < 0.00001$); $I^2 = 92\%$ Test for overall effect: $Z = 1.85$ ($P = 0.06$) Test for subgroup differences: $\text{Chi}^2 = 0.09$, $\text{df} = 1$ ($P = 0.76$), $I^2 = 0\%$									

APÊNDICE B – Avaliação da qualidade dos estudos com animais

Levando-se em consideração as recomendações de SYRCLES, realizou-se a avaliação da qualidade dos estudos que utilizaram animais em suas pesquisas. A similaridade basal entre os grupos busca avaliar fatores intrínsecos dos animais ou de prognóstico, que permitem avaliar se os grupos controles e tratados eram idênticos no início dos experimentos. O sigilo de alocação se baseia em determinar se era possível prever os grupos controle e de experimentais *a priori*. “Cegamentos” envolvem o desconhecimento dos cuidadores dos animais ou avaliadores de desfecho acerca de quais seriam os grupos controle ou tratados.

A recomendação feita por Hoojimans *et al.* (2014), visa minimizar riscos de viés nas pesquisas com animais e foi reportada aqui com adaptações. O uso dessas recomendações visa melhorar a avaliações dos estudos para as revisões sistemáticas. Como em grande parte dos artigos abaixo foram feitas infecções experimentais e avaliações celulares e teciduais *in vitro* ou por histologia, a aplicabilidade de tais pontos poderia ser mais relevante em nível celular.

¹Quadro A – Risco de viés nos estudos

Estudos	Similaridade basal dos grupos	Sigilo de alocação	"Cegamento" dos cuidadores para grupos controle vs. tratados	Seleção aleatória dos animais para medição do desfecho	"Cegamento" dos avaliadores de desfecho
Dhiman & Garg 2011	P	ND	ND	ND	ND
Paiva <i>et al.</i> 2012	ND	ND	ND	ND	ND
Dhiman & Garg 2014.	P	ND	ND	ND	ND
Gutierrez <i>et al.</i> 2014.	ND	ND	ND	ND	ND
Barroso <i>et al.</i> 2016	ND	ND	ND	ND	ND
Goes <i>et al.</i> 2016.	P	ND	ND	ND	ND
Vilar-Pereira <i>et al.</i> 2016.	P	PN	PN	PN	PN
Contreras-Ortiz <i>et al.</i> 2017	P	ND	ND	ND	ND

P= parcialmente; PN = possivelmente não, já que os animais foram marcados com etiquetas individualmente nas orelhas; ND: não declarado/não determinado. Fonte: Adaptado de Hoojimans *et al.* (2014)

¹ Adaptado de Hoojimans *et al.* (2014).

APÊNDICE C – Cálculos estatísticos realizados pelo *Review Manager (RevMan)*

Referem-se aos tópicos retirados integralmente, com tradução livre, ou adaptados de *Standardized difference in means (standardized mean difference)*; *Inverse-variance methods for combining results across studies*; *Test for presence of an overall intervention effect* de *Statistical algorithms in Review Manager 5* (DEEKS & HIGGINS, 2010); *Identifying and measuring heterogeneity* (HIGGINS & GREEN, 2011) os quais se referem aos cálculos e modelos matemáticos usados para a realização das meta-análises do estudo.

Cálculo das Diferenças de médias padronizadas (SMD)

O programa *Review Manager* versão 5.4 utiliza o fator de correção de Hedges ajustado para g, que inclui um fator de correção para vieses de pequeno tamanho amostral:

$$SMD_i = \frac{m_{1i} - m_{2i}}{s_i} \left(1 - \frac{3}{4N_i - 9} \right),$$

Em que, N é o número de participantes de cada estudo e s_i o desvio-padrão agrupado dos dois grupos:

$$N_i = n_{1i} + n_{2i}$$

$$s_i = \sqrt{\frac{(n_{1i} - 1)sd_{1i}^2 + (n_{2i} - 1)sd_{2i}^2}{N_i - 2}}$$

Método do Inverso da Variância para a Combinação de Resultados entre Estudos

O peso de cada estudo individual é dado pela fórmula:

$$w_i = \frac{1}{(SE \{SMD_i\})^2}$$

De modo combinado, fornecem a estimativa sumarizada:

$$SMD_{IV} = \frac{\sum w_i SMD_i}{\sum w_i}$$

A heterogeneidade é calculada por:

$$Q_{IV} = \sum w_i (SMD_i - SMD_{IV})^2$$

Cálculos do Teste do I-quadrado (I^2) ou Teste de Higgins Thompson

A fórmula abaixo representa a estatística de qui-quadrado (Q) e seus graus de liberdade (df):

$$I^2 = \left(\frac{Q - df}{Q} \right) \times 100\%$$

De modo mais completo e se referindo ao método do Inverso da Variância:

$$I^2 = \max \left\{ 100\% \times \frac{Q_{IV} - (k-1)}{Q_{IV}}, 0 \right\}.$$

$Q_{IV} = \sum w_i (SMD_i - SMD_{IV})^2$; $k-1 = df$, $k = \text{número de estudos contribuindo para a meta-análise}$