

**Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-Graduação em Ecologia**

Kássia Karoline Malta Oliveira

**POPULAÇÕES CELULARES EM GRANULOMAS ESQUISTOSSOMÓTICOS:
BIOLOGIA CELULAR EM UMA PERSPECTIVA ECOLÓGICA**

JUIZ DE FORA
2019

**Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-Graduação em Ecologia**

Kássia Karoline Malta Oliveira

**POPULAÇÕES CELULARES EM GRANULOMAS ESQUISSOMÓTICOS:
BIOLOGIA CELULAR EM UMA PERSPECTIVA ECOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada a Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rossana Correa Netto de Melo
Co-Orientador: Prof. Dr. Thiago Pereira da Silva

JUIZ DE FORA
2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Malta Oliveira, Kássia Karoline.

Populações Celulares em Granulomas Esquistossomóticos: Biologia Celular em uma Perspectiva Ecológica / Kássia Karoline Malta Oliveira. -- 2019.

89 f. : il.

Orientadora: Rossana Correa Netto de Melo

Coorientador: Thiago Pereira da Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ecologia, 2019.

1. Ecologia Celular. 2. Schistosoma mansoni granuloma. 3. Comunidade Celular. 4. Populações Celulares. 5. Whole Slide Imaging. I. Netto de Melo, Rossana Correa, orient. II. Pereira da Silva, Thiago, coorient. III. Título.

**"POPULAÇÕES CELULARES EM GRANULOMAS ESQUISTOSSOMÓTICOS:
BIOLOGIA CELULAR EM UMA PERSPECTIVA ECOLÓGICA"**

Kássia Karoline Malta Oliveira

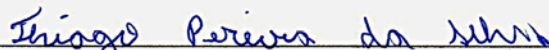
Orientadora: Profa. Dra. Rossana Correa Netto de Melo

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de mestre em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

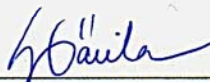
Aprovado em 26 de fevereiro de 2019.



Profa. Dra. Rossana Correa Netto de Melo
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF



Prof. Dr. Thiago Pereira da Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF



Profa. Dra. Sthéfane D'ávila de Oliveira e Paula
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF



Prof. Dr. Felipe Ferraz Dias
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

À minha mãe, familiares e amigos,
Dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, onipotente, *onisciente e onipresente* que me capacitou em todos os desafios desse processo de aprendizado crescimento profissional e pessoal.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que direta e indiretamente tiveram papel fundamental para a realização do presente trabalho. Amigos, saibam que caso eu esqueça de mencioná-los aqui, não significa que não são importantes mas que como sempre deixei pra “última hora”.

Agradeço à minha orientadora Dra. Rossana Melo, pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho, confiança e incentivo e a todos os momentos de discussões de ideias, inspirações e suporte.

Ao meu co-orientador Dr. Thiago Pereira da Silva, que foi o elemento chave e essencial para o desenvolvimento desse trabalho. Serei eternamente grata pela oportunidade de desenvolver esse projeto com você. Obrigada pelo apoio pessoal e profissional durante todo o processo. Obrigada por acreditar e sempre me incentivar. Obrigada por manter meu pé no chão quando não era possível voar, obrigada por todas as discussões que foram extremamente enriquecedoras durante o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por ter me ajudado a segurar as pontas, principalmente na reta final! Gratidão sempre por você!

Ao Dr. Felipe Dias, pelo primeiro incentivo a carreira acadêmica, durante a iniciação científica, por me inspirar a seguir em frente. Pelas colaborações durante todo o processo e pela amizade.

À minha mãe, que sempre me incentiva a seguir meus sonhos, mesmo que sejam abstratos e beirem o impossível. Por entender minhas necessidades mesmo sem entender meu trabalho de pesquisa. Por sempre me incentivar a estudar mais. Pelo afeto e colo diário, que foram essenciais para que eu mantivesse de pé até a conclusão desse ciclo. Por se preocupar com minha saúde quando eu a deixava de lado e por estar sempre presente para mim. Te amo!

Ao meu pai, que me ensinou a amar a vida em toda sua complexidade. Mesmo em saudade ainda me ensina e inspira.

Aos meus familiares que de longe e de perto torceram, sofreram e sorriram comigo. Principalmente a querida tia Alcione e ao querido primo Dener. Aos meus afilhados Júlia e David por todo abraço sincero e carinho acolhedor.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Yuri Carvalho. Que esteve presente durante todo o processo de desenvolvimento desse trabalho e que me incentivou a não desistir sem ao menos tentar, que foi essencial. Obrigada por ser quem é e por estar em minha vida em todos os momentos, felizes e tristes. Obrigada por me levar até sua família, que hoje também é minha família. Agradeço a Ana, Larissa e Jorge pela acolhida de amor e todo zelo que têm comigo.

À querida amiga Letícia, que mesmo a um oceano de distância se fez presente em todo processo. Obrigada por sempre ouvir, incentivar, puxar minha orelha quando necessário. Agradeço também a seus pais Rosi e Wiliam, que acompanham minha trajetória desde a infância.

À querida amiga Sheila, que embarcou nessa comigo! Obrigada por sempre estar disposta a escutar, apoiar, incentivar e oferecer alternativas quando eu só enxergava um caminho. Obrigada pelo incentivo às desconstruções. Pelos *insights* surgidos das “ecologias” discutidas. Você foi fundamental Shei!!

Às amigas Lívia Andressa e Nathália Resende, por todos os momentos de descontração, pelo suporte profissional e emocional. Por serem pessoas sensacionais, vocês são pra vida toda!

Aos companheiros e amigos de laboratório Cíntia, Vitor, Andréia, Igor, Bruno, Kennedy, Juliana, Victor, Laíris e Adriana. Obrigada por fazerem parte da rotina e tornarem a trajetória leve. Obrigada por enriquecerem as discussões durante a construção desse trabalho, principalmente aos ICs Cíntia e Vitor que foram fundamentais nesse processo e a conclusão desse trabalho.

Aos amigos Alexssandra, Camilla, Flávio e Tayrine obrigada pelos momentos fora da rotina, pelos almoços na malaco, e por compartilharem as chagas da pós comigo.

Às amigas Ane, Elen, Cirlene, Bruna, Jéssica e Juliana por entenderem minhas ausências e por torcerem sempre por minhas conquistas. Vocês são demais.

Agradeço ao PGECOL/UFJF por contribuir em minha formação acadêmica até aqui. Obrigada a todos os docentes, coordenadores, colegas discentes e as secretárias Rosi e Priscila sempre dispostas a ajudar.

As agências de fomento que financiaram a execução desse trabalho, CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Finalizo com o coração repleto de gratidão por todos os desafios dessa trajetória, todos os parceiros que estiveram comigo, por todas as trocas, todos os aprendizados que me trouxeram até aqui.

É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu.
Ana Vilela

RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária causada pelo trematódeo difenético do gênero *Schistosoma*. Ela constitui um grave problema de saúde pública. Atualmente, mais de 240 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas por esta parasitose e estima-se que mais de 700 milhões de pessoas estão em risco de infecção em 78 países e territórios de regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Caribe e América do Sul. A esquistossomose possui como característica histopatológica marcante a formação de granulomas em órgãos-alvo do hospedeiro vertebrado. Granulomas se formam em torno de cada ovo do parasito, que chegam aos tecidos hospedeiros metabolicamente ativos. As substâncias liberadas por eles levam ao recrutamento de inúmeras células, que em conjunto com as células do órgão alvo e da matriz extracelular rica em colágeno, constroem a estrutura dinâmica dos granulomas. Tais estruturas têm sido extensamente estudadas sob o ponto de vista da imunologia, parasitologia e biologia celular, mas pouco se sabe sob o ponto de vista da ecologia celular. No presente trabalho, definimos o granuloma esquistossomótico hepático murino como sistema ecológico, sob o ponto de vista da ecologia celular. Em paralelo, investigamos a composição e distribuição das populações de células inflamatórias no granuloma hepático durante estágios evolutivos da esquistossomose mansônica experimental. Nessa perspectiva, propusemos que granulomas funcionam como verdadeiros sistemas ecológicos e que o conjunto das populações celulares lá encontradas constituem uma verdadeira comunidade celular, além de sugerir que sua formação ocorre como uma sucessão ecológica em ambientes de escala maior. Foi possível identificar e quantificar todas as populações celulares encontradas, através da utilização da técnica de *whole slide imaging*, a qual permitiu visualizar secções inteiras do fígado. Ao aplicar estratégias clássicas de investigações de diversidade no granuloma, detectamos que durante o processo de evolução, a riqueza (número de populações) se mantém, mas as freqüências de abundância flutuam, ou seja, todas as células identificadas estão presentes em todos os estágios de evolução dos granulomas, mas a quantidade varia ao longo do processo. Nesse contexto, é necessário a investigação dos fatores que regulam as abundâncias das populações celulares durante a construção dos granulomas. Descrever as interações que neles existem em um contexto amplo pode ser a chave para entender a complexidade dessa resposta e apontar novos alvos terapêuticos.

PALAVRAS CHAVE: *S. mansoni* granuloma; hepático; murino; ecologia celular; populações celulares; comunidade celular; *whole slide imaging*

ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni is a parasitic disease caused by hematophagous worms of the genus *Schistosoma*. It is a serious public health problem. Currently, more than 240 million people worldwide are affected by this parasite and it is estimated that more than 700 million people are at risk of infection in 78 countries and territories of tropical and subtropical regions of Africa, Asia, Caribbean and South America. Schistosomiasis has a striking histopathological characteristic: the granuloma formation in target organs of vertebrate hosts. Granulomas form around each egg of the parasite, which reach metabolically active host tissues. The substances released by parasite eggs lead to the recruitment of numerous cells, which together with the target organ cells and the collagen-rich extracellular matrix, build the dynamic structure of the granulomas. Such structures have been extensively studied from the standpoint of immunology, parasitology and cell biology, but little is known from the point of view of cellular ecology. Here, we defined murine hepatic schistosomiasis granuloma as an ecological system, from the point of view of cellular ecology. In parallel, we investigated the composition and distribution of inflammatory cell populations in hepatic granuloma during the evolutionary stages of the experimental schistosomiasis mansoni. In this perspective, we proposed that granulomas works as a true ecological system and all cellular populations found there constitute a true cellular community. Moreover, we suggested that granuloma formation occurs as an ecological succession compared to larger scale environments. We identified and quantified all the cellular populations found there, using a whole slide imaging technique, which enabled visualization of entire sections of the liver. Applying classic strategies of diversity investigations in the granuloma, we detected that during the process of evolution, the richness (number of populations) remains the same in all granuloma formation process. On the other hand, the abundance frequencies values fluctuate, that is, all the cells identified are present at all stages of granuloma evolution, but the quantity varies throughout the process. Thus, it is important to investigate the factors that regulate the abundances of the cellular populations during the construction of granulomas. Describing the cell-cell interactions that exist in the granuloma, in a broad context, may be the key to understanding the complexity of this response and pointing to new therapeutic targets.

KEYWORDS: *S. mansoni* granuloma; hepatic murine; cellular ecology; cell population; cell community; *whole slide imaging*

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ECM	Collagen-rich extracellular matrix
WSI	Whole slide imaging
HSCs	Hepatic stellate cells
PE	Pre-granulomatous exudative/ Pré- granulomatoso exudativo
NE	Necrotic-exudative/ Necrótico exudativo
EP	Exudative-productive/ Exudativo Productivo
P	Productive/ Productivo
GMA	Glicolmetacrilato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REFERÊNCIAS	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 CAPÍTULO 1- THE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> HEPATIC GRANULOMA POISED AS AN INTEGRATING AND EVOLVING ECOSYSTEM	22
4.1 ABSTRACT.....	22
4.2 INTRODUCTION.....	23
4.3 THE <i>S. MANSONI</i> HEPATIC GRANULOMA.....	24
4.3.1 THE SCHISTOSOMAL GRANULOMA AS AN ECOSYSTEM.....	26
4.3.2 GRANULOMA PRESENTS SEVERAL ECOLOGICAL NICHES FOR DIFFERENT CELL POPULATIONS.....	28
4.4 INTEGRATED CELL POPULATIONS INHABIT GRANULOMAS.....	31
4.5 COLONIZATION OF CELL COMMUNITIES DURING GRANULOMA FORMATION: AN ECOLOGICAL SUCESSION?.....	33
4.6 CONCLUDING REMARKS	37
4.7 REFERENCES	39
5 CAPÍTULO 2- ASPECTOS DESCRITIVOS DA COMUNIDADE CELULAR DO GRANULOMA HEPÁTICO AO LONGO DE SUA EVOLUÇÃO DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EXPERIMENTAL	48
5.1 INTRODUÇÃO	48
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	49
5.2.1 ANIMAIS E INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	49
5.2.2 EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS.....	49
5.2.3 COMITÊ DE ÉTICA.....	50
5.2.4 INCLUSÃO EM RESINA.....	50
5.2.5 MICROTOMIA E COLORAÇÃO.....	51
5.2.6 ANÁLISE DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS POR " <i>Whole Slide Imaging</i> " (WSI).....	52
5.2.6.1 NÚMERO DE GRANULOMAS POR ÁREA SECCIONAL.....	53
5.2.6.2 CLASSIFICAÇÃO DOS GRANULOMAS EM ESTÁGIOS EVOLUTIVOS.....	53

5.2.6.3 IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS EM GRUPOS CELULARES ESPECÍFICOS (POPULAÇÕES CELULARES).....	54
5.2.7 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA COMPOSIÇÃO CELULAR AO LONGO DA EVOLUÇÃO DO GRANULOMA.....	54
5.2.7.1 AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DESCRITIVOS DA COMUNIDADE CELULAR DOS GRANULOMAS.....	55
5.2.7.2 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES NA ZONAÇÃO MORFOLÓGICA DO GRANULOMA.....	56
5.2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	56
5.3 RESULTADOS.....	57
5.3.1 OCORRÊNCIA DE GRANULOMAS ESQUISTOSSOMÓTICOS NO TECIDO HEPÁTICO.....	57
5.3.2 POPULAÇÕES CELULARES DO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO HEPÁTICO.....	61
5.3.3 RIQUEZA E SIMILARIDADE DA COMUNIDADE CELULAR DO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO HEPÁTICO.....	64
5.3.4 ABUNDÂNCIA E DENSIDADE DAS POPULAÇÕES CELULARES DO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO HEPÁTICO.....	66
5.3.5 DIVERSIDADE DAS POPULAÇÕES CELULARES DO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO HEPÁTICO.....	67
5.3.6 DISTRIBUIÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES NO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO HEPÁTICO.....	70
6 DISCUSSÃO.....	72
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	77
8 REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO GERAL

A esquistossomose é uma doença parasitária causada pelo trematódeo difenético do gênero *Schistosoma* e constitui um grave problema de saúde pública. Atualmente, mais de 240 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas por esta parasitose e estima-se que mais de 700 milhões de pessoas estão em risco de infecção em 78 países e territórios de regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Caribe e América do Sul (Who, 2019). A esquistossomose é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada, não ocorrendo nas áreas tropicais apenas devido às características climáticas únicas destas regiões, mas também por se tratarem das áreas mais pobres do planeta (Who, 2008). O *Schistosoma mansoni* é a única espécie do gênero *Schistosoma* que ocorre no Brasil. Atualmente, estima-se que existam no Brasil aproximadamente seis milhões de indivíduos infectados com o *S. mansoni* e 25 milhões em risco de contrair a infecção.

A infecção esquistossomótica acomete principalmente o fígado e os intestinos dos hospedeiros infectados. Os parasitos adultos colonizam os vasos sanguíneos do plexo mesentérico e sistema porta hepático enquanto as fêmeas expõem centenas de ovos diariamente, que são excretados do corpo do hospedeiro através das fezes ou se alojam em tecidos adjacentes, induzindo uma resposta granulomatosa imunomediada distinta ao redor dos ovos (Pearce *et al.*, 2004; Chuah *et al.*, 2014b; Mcmanus *et al.*, 2018b). A infecção por *S. mansoni* possui como característica marcante a formação de granulomas em tecidos alvo, como no fígado e intestinos (Akpom e Warren, 1975; Adams, 1976; Hams *et al.*, 2013b). Na esquistossomose hepática, a formação de granuloma surge quando os ovos do parasito ficam aprisionados nas vênulas capilares pré-sinusoidais do fígado do hospedeiro, fixando-se no tecido hepático após cruzar os vasos (Lenzi *et al.*, 1998) (Chuah *et al.*, 2014b). O granuloma esquistossomótico é uma estrutura esférica, dinâmica e organizada, formada por grupos de células inflamatórias recrutadas e células residentes do tecido associadas por uma matriz extracelular heterogênea, em torno dos ovos do parasito (Lenzi *et al.*, 1998).

Durante a infecção experimental pelo *S. mansoni* em modelos murinos, o fígado pode ser considerado o principal local de formação de granulomas, já que

mais de 50% dos ovos ficam presos nos vasos capilares sinusóides hepáticos (Reis *et al.*, 1984). O granuloma pode ser considerado uma estrutura híbrida, com componentes do hospedeiro e do parasito, compreendidos como organismos em busca de simbiose. Como os ovos de *S. mansoni* no fígado do hospedeiro são viáveis e metabolicamente ativos, a função do granuloma hepático vai muito além de atacar os miracídios, mas para proteger os tecidos do hospedeiro isolando as toxinas secretadas pelos ovos (Reis *et al.*, 1984; Lenzi *et al.*, 1998; Co *et al.*, 2004; Alenzi, 2008; Pagán e Ramakrishnan, 2018). Entretanto, a magnitude do evento inflamatório inicial e seu reparo fibroso, compensados pela relativa eficácia e força do processo de imunomodulação subsequente no fígado, são os elementos-chave no curso geral e na gravidade da doença (Reis *et al.*, 1984; Coelho *et al.*, 1996; Burke *et al.*, 2009).

O granuloma esquistossomótico tem sido descrito como um sistema biológico espaço-temporal complexo formado por componentes que interagem de forma complexa, não podendo ser descrito por modelos simplistas (Lenzi e Romanha, 2003; Lenzi *et al.*, 2004). Este apresenta-se como um sistema não linear evolutivo, pois evolui de uma desordem aparente (estágio pré-granulomatoso) para um arranjo bem organizado (estágio granulomatoso) (Lenzi *et al.*, 1998; Lenzi e Romanha, 2003; Lins, R. a. B. *et al.*, 2008). Além de possuírem componentes autopoéticos, capazes de gerar diversas populações celulares (como populações de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos B, plasmócitos), os granulomas também sofrem modulações intrínsecas e extrínsecas (Lenzi *et al.*, 1995; Lenzi *et al.*, 2008). Nesse processo, as células interagem entre si e com a matriz extracelular que é constantemente construída (depositada) e desconstruída (absorvida) (Lenzi *et al.*, 1999a; Lenzi *et al.*, 2004; Ahmad e Ahmad, 2012). O que determina o percurso evolutivo do granuloma esquistossomótico ainda é desconhecido apesar de os padrões morfológicos estarem bem determinados e variarem de acordo com os objetivos dos estudos (Hsü *et al.*, 1972; Lenzi *et al.*, 1998; Lenzi *et al.*, 2008; Lins, R. a. B. *et al.*, 2008).

Torna-se cada vez mais reconhecido que existe um número de paralelos entre os sistemas biológicos e os sistemas ecológicos (De Sousa, 1973; Gatenby, 1991; Steidl, 2017). Classicamente, a ecologia estuda comportamentos e interações de organismos entre si e com o meio ambiente. Mas as perspectivas ecológicas não estão limitadas a apenas uma escala espacial. As células também têm ecologia,

com interações tão sutis e interessantes quanto àquelas em escalas maiores. Estudos recentes têm aplicado visões paralelas entre ecologia e biologia celular, a fim de melhor entender o comportamento e as respostas das células em uma perspectiva ecossistêmica (Gatenby, 1991; Merlo *et al.*, 2006; Papayannopoulou e Scadden, 2008; Amend *et al.*, 2016). Esta crescente área de pesquisa tem sido reconhecida como ecologia celular.

Os estudos com ecologia celular usam termos e conceitos emprestados da ecologia clássica para definir e compreender comportamentos e interações celulares relacionados com a fisiologia e a patologia em seu contexto orgânico (Papayannopoulou e Scadden, 2008; Pienta *et al.*, 2008; Kareva, 2011). Por exemplo, o câncer tem sido amplamente descrito como um sistema ecológico dinâmico e em evolução (Kaplan *et al.*, 2006; Kareva, 2011; 2015; Lacina *et al.*, 2018). Células cancerosas dentro de um tumor são geneticamente e fenotipicamente heterogêneas; elas competem por espaço e nutrientes, interagem com as células do sistema imunológico, migram (metástases), tudo dentro do microambiente local do tecido e, mais globalmente, dentro do corpo humano (Kareva, 2011; Amend *et al.*, 2016). Esta perspectiva ecológica tem gerado grande potencial para o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento farmacológico do câncer (Pienta *et al.*, 2008; Korolev *et al.*, 2014; Gatenby e Brown, 2018). Por exemplo, nos ecossistemas da medula óssea, tanto as células cancerígenas como as saudáveis requerem um fornecimento constante de nutrientes da corrente sanguínea. A massa tumoral estimula a neoangiogênese, que não é necessária para o corpo e foi reconhecida como um importante alvo terapêutico. Três estratégias para inibir a neoangiogênese em tumores estão em desenvolvimento. Um desses alvos bloqueando o aparecimento de vasos na matriz extracelular, inibindo a ligação da integrina e, conseqüentemente, inibindo o crescimento do tumor (Pienta *et al.*, 2008).

Algumas dessas extrapolações ecológicas podem ser feitas para o granuloma esquistossomótico hepático, que funciona como um processo ecológico (ecossistema celular) para diversas células inflamatórias, capazes de em conjunto, formar uma comunidade complexa em integração e evolução. Nesse sentido, a compreensão interdisciplinar dos sistemas biológicos, utilizando o granuloma esquistossomótico como modelo de estudo, pode contribuir para o desenvolvimento

de novos paradigmas e perspectivas em torno da formação e composição de estruturas biológicas em diversos contextos celulares e teciduais.

2 REFERÊNCIAS

ADAMS, D. O. The granulomatous inflammatory response. A review. **The American Journal of Pathology**, v. 84, n. 1, p. 164, 1976.

AHMAD, A.; AHMAD, R. Understanding the mechanism of hepatic fibrosis and potential therapeutic approaches. **Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 18, n. 3, p. 155, 2012.

AKPOM, C. A.; WARREN, K. S. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs. **The American Journal of Pathology**, v. 79, n. 3, p. 435, 1975.

ALENZI, F. Q. Apoptosis and eosinophils. Regulation and clinical relevance. **Saudi Medical Journal**, v. 29, n. 5, p. 643-656, 2008. ISSN 1658-3175.

AMEND, S. R. et al. Ecological paradigms to understand the dynamics of metastasis. **Cancer Letters**, v. 380, n. 1, p. 237-242, 2016. ISSN 0304-3835.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 163-176, 2009. ISSN 1365-3024.

CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 141-150, 2014. ISSN 1471-4922.

CO, D. O. et al. T cell contributions to the different phases of granuloma formation. **Immunology Letters**, v. 92, n. 1-2, p. 135-142, 2004. ISSN 0165-2478.

COELHO, P. M. Z. et al. *Schistosoma mansoni*: permanence of modulation of the granulomatous inflammatory response in mice cured in the chronic phase. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 12, p. 1393-1395, 1996. ISSN 0020-7519.

DE SOUSA, M. A. B. Ecology of thymus dependency. **Contemporary Topics in Immunobiology**, v. 1, n. 1, p. 119-136, 1973.

GATENBY, R.; BROWN, J. The evolution and ecology of resistance in cancer therapy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 3, p. a033415, 2018. ISSN 2157-1422.

GATENBY, R. A. Population ecology issues in tumor growth. **Cancer Research**, v. 51, n. 10, p. 2542-2547, 1991. ISSN 0008-5472.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The schistosoma granuloma: friend or foe? **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 89, 2013. ISSN 1664-3224.

HSÜ, S. L. et al. Comparative studies on the lesions caused by eggs of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in livers of albino mice and rhesus monkeys. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 66, n. 1, p. 89-97, 1972. ISSN 0003-4983.

KAPLAN, R. N.; RAFII, S.; LYDEN, D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. **Cancer Research**, v. 66, n. 23, p. 11089-11093, 2006. ISSN 0008-5472.

KAREVA, I. What can ecology teach us about cancer? **Translational Oncology**, v. 4, n. 5, p. 266-270, 2011. ISSN 1936-5233.

KAREVA, I. Cancer ecology: Niche construction, keystone species, ecological succession, and ergodic theory. **Biological Theory**, v. 10, n. 4, p. 283-288, 2015. ISSN 1555-5542.

KOROLEV, K. S.; XAVIER, J. B.; GORE, J. Turning ecology and evolution against cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 5, p. 371, 2014. ISSN 1474-1768.

LACINA, L. et al. Ecology of melanoma cell. **Histology and Histopathology**, p. 247-254, 2018.

LENZI, H. L. et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 141-151, 1998. ISSN 0074-0276.

LENZI, H. L. et al. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 5, p. 639-643, 1999. ISSN 0100-879X.

LENZI, H. L. et al. Extramedullary hematopoiesis in murine schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 169-177, 1995. ISSN 0074-0276.

LENZI, H. L.; ROMANHA, W. S. **Schistosomal granuloma is like a small multicellular organism that operates as a complex system.** 2003.

LENZI, H. L.; ROMANHA, W. S.; PELAJO-MACHADO, M. Possíveis níveis de complexidade na modelagem de sistemas biológicos Pode a matemática coreografar a dança biológica? In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE MATEMÁTICA APLICADA E COMPUTACIONAL, S. C., SP (Ed.). **Notas em Matemática Aplicada: Modelagem em Biomatemática**, 2004. p. 54-78

LENZI, H. L. et al. **Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico.** 2008. 569-654.

LINS, R. A. B. et al. A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 41, p. 173-178, 2008.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 13, n. 4, p. 1-19, 2018.

MERLO, L. M. F. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 12, p. 924, 2006. ISSN 1474-1768.

PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. The formation and function of granulomas. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 639-665, 2018. ISSN 0732-0582.

PAPAYANNOPOULOU, T.; SCADDEN, D. T. Stem-cell ecology and stem cells in motion. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3923-3930, 2008. ISSN 0006-4971.

PEARCE, E. J. et al. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 117-126, 2004. ISSN 0105-2896.

PIENTA, K. J. et al. Ecological therapy for cancer: defining tumors using an ecosystem paradigm suggests new opportunities for novel cancer treatments. **Translational Oncology**, v. 1, n. 4, p. 158-164, 2008. ISSN 1936-5233.

REIS, R. J. N. et al. Esquistossomose mansoni: Diagnóstico pela biópsia retal e parasitológico em 100 casos selecionados. **Revista Brasileira Coloproctologia**, v. 4, n. 2, p. 99-101, 1984.

STEIDL, C. The ecosystem of classical Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 130, n. 22, p. 2360-2361, 2017. ISSN 0006-4971.

WHO. **The social context of schistosomiasis and Its Control**. GENEVA, S. 2008.

WHO. <https://www.who.int/schistosomiasis/en/>. 2019. Acesso em: 03 fevereiro.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o granuloma esquistossomótico hepático sob o ponto de vista da ecologia celular. Em paralelo, investigar a composição e distribuição espacial e temporal das populações de células inflamatórias no granuloma hepático durante estágios evolutivos da esquistossomose mansônica experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Propor o granuloma esquistossomótico hepático como um integrado ecossistema celular baseado no conhecimento atual dos granulomas hepáticos formados durante a infecção por *S.mansoni* em camundongos;
- Estudar os granulomas esquistossomóticos hepáticos durante os estágios evolutivos, ao longo do desenvolvimento da esquistossomose mansônica experimental;
- Caracterizar e quantificar as populações de células presentes nos granulomas hepáticos murinos;
- Avaliar aspectos descritivos da composição e organização espacial da comunidade de células inflamatórias do granuloma ao longo de seu desenvolvimento;
- Avaliar aspectos da diversidade dos granulomas esquistossomóticos hepáticos murinos.

4 CAPÍTULO 1- THE *SCHISTOSOMA MANSONI* HEPATIC GRANULOMA POISED AS AN INTEGRATING AND EVOLVING ECOSYSTEM

Neste capítulo, é apresentado um artigo de perspectiva, onde revisamos o conhecimento atual dos granulomas hepáticos formados durante a infecção por *S. mansoni* em camundongos e propomos que essas estruturas funcionem como um verdadeiro sistema ecológico. Discutimos como as populações de células desse intrincado sistema interagem entre si e com microambiente para formar comunidades celulares funcionalmente ativas e complexas em diferentes quadros espaço-temporais.

4.1 ABSTRACT

A primary challenge to understand schistosomiasis mansoni, a neglected tropical disease of great social impact, is to unveil how a granuloma establishes and functions in target organs of infected hosts, such as the liver. Granulomas are extraordinarily built to circumvent the parasite eggs trapped in host tissues. They constitute the most striking histopathological finding of the disease and, despite largely studied, remain as enigmatic aggregates of immune and tissue resident cells merged in an rich content of extracellular matrix and biomodulatory molecules, all fluctuating in composition and spatial organization during evolutionary stages. In this perspective article, we review our current knowledge of hepatic granulomas formed during the *S. mansoni* infection in mice and propose that these structures act as a true ecological system. We discuss how diverse cell populations from this intricate system integrate with themselves and with the microenvironment to form an evolving, functionally active and complex cell community in different space-time frames. Changes in cellular, molecular and architectural framework of the granuloma are explored as a process of “ecological succession”. By changing our current view of schistosomal granuloma to an ecological standpoint, we can draw attention to cellular events/behaviors that may be central to the understanding of the disease thus enabling adequate treatment/control.

4.2 INTRODUCTION

Schistosomiasis is a neglected tropical disease resulting from infection with parasitic trematode worms from the genus *Schistosoma*. Schistosomiasis is endemic in 78 countries and affects at least 200 million people worldwide (Who, 2011). The disease is acquired when free-swimming parasitic larvae (cercariae), released by freshwater snails, penetrate the skin of people exposed to infested freshwater (reviewed in (Mcmanus *et al.*, 2018a).

A number of different species of schistosomes cause disease in humans including *Schistosoma mansoni* (Who, 2011). Infection with this parasite produces marked chronic morbidity with development of a severe inflammatory reaction, particularly in the liver and intestines, which can lead to life-threatening hepatosplenomegaly (reviewed in (Hams *et al.*, 2013a; Mcmanus *et al.*, 2018a). The most striking histopathological feature of schistosomiasis mansoni is the formation of granulomas, aggregates of inflammatory cells and tissue resident cells merged in a collagen-rich extracellular matrix (ECM), established around mature parasite eggs deposited in target organs (reviewed in (Hams *et al.*, 2013a; Schwartz e Fallon, 2018).

Schistosomal granulomas have been described as dynamic, self-organized and complex systems formed by host and parasite components (Lenzi *et al.*, 1998; Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006). These highly arranged structures, which show maturative and involutinal stages in their development, are regarded as “little organs” with sophisticated biomechanical properties and functional activities so integrated that the “function of the fully formed granuloma is literally greater than the sum of the actions of its individual cells” (Lenzi *et al.*, 1998; Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006).

We have been studying the formation, composition and evolutionary stages of granulomas as well as the extent of this granulomatous inflammatory response in target organs of both natural and experimental *S. mansoni* infections using different approaches Amaral, K. B. *et al.* (2016); (Amaral *et al.*, 2017a); Dias, Amaral, Malta, Silva, Rodrigues, Rosa, Rodrigues, Chiarini-Garcia, *et al.* (2018); Dias, Amaral, Malta, Silva, Rodrigues, Rosa, Rodrigues, Costa, *et al.* (2018). Here, we review our current knowledge of hepatic granulomas formed during the *S. mansoni* infection in

mice and propose a new view of these structures as finely tuned ecosystems.

4.3 THE *S. MANSONI*/HEPATIC GRANULOMA

Adult schistosome worms colonize blood vessels while expelling hundreds of eggs daily, which are either excreted from the host body through the feces or become lodged in proximate tissues inducing a distinct immune-mediated granulomatous response around the eggs (Pearce e Macdonald, 2002; Chuah *et al.*, 2014a; Mcmanus *et al.*, 2018a). In hepatic schistosomiasis, granuloma formation arises when schistosome eggs become trapped in the pre-sinusoidal capillary venules of the host liver, settling in the hepatic tissue after crossing the vessels (Lenzi *et al.*, 1998; Chuah *et al.*, 2014a; Schwartz e Fallon, 2018).

The development of granulomas has been extensively studied in the liver from *S. mansoni*-infected mice (Weinstock e Blum, 1983; Stadecker e Wright, 1984, Ragheb, 1989 #7763; Lenzi *et al.*, 1998; Lenzi *et al.*, 1999b; Swartz, Dyer, Cheever, Ramalingam, Pesnicak, Domachowske, Lee, Lee, Foster, Wynn, *et al.*, 2006; Amaral *et al.*, 2017b; Dias, Amaral, Malta, Silva, Rodrigues, Rosa, Rodrigues, Costa, *et al.*, 2018). In these models, more than 50% of the eggs become trapped in the liver sinusoids (Anderson e Cheever, 1972b). Based on histopathological analyses, it is recognized, at least, two main stages in the process of granuloma formation in the liver of both experimental models humans: a pre-granulomatous stage characterized by early influx and arrangement of the cells around the eggs; and a granulomatous stage with distinct subtypes, in which the granuloma goes from a maturative to an involutinal state (Hsu *et al.*, 1972; Lenzi *et al.*, 1998; Raso, Raso, Melo Fde, *et al.*, 2012) (Figure 1). In our studies, we have adopted the following classification/nomenclature to identify hepatic granuloma types formed during the murine experimental *S. mansoni* infection (Figure 1): i) pre-granulomatous exudative (PE): characterized by an infiltrate of inflammatory cells in process of organization around the parasite egg; ii) necrotic-exudative (NE): identified by a central halo of necrosis and numerous inflammatory cells distributed irregularly on subsequent layers; exudative-productive (EP), characterized by a rich structure of collagen fibers and inflammatory cells concentrated in the periphery and showing a more organized

and circumferential aspect; and productive (P), with a typical thick band of collagen fibers between the egg and few numbers of inflammatory cells (Amaral *et al.*, 2017b). However, it is important to take into account that there are different classifications and all of them are useful just to detect morphological aspects denoting evolutionary events. In fact, each granuloma represent a dynamic evolutionary non-linear system, since it evolves from an apparent disorder (pre-granulomatous stage) to a well-organized arrange (granulomatous stage) and should be considered *in toto* for better appreciation and understanding of its functional capabilities.

As a general feature, granulomas have variable size and cell composition depending on their evolutionary phases. A spectrum of different immune and resident cells colonizes schistosomal granulomas. The cell populations found in hepatic granulomas of infected mice are described in Table 1. By using whole slide imaging (WSI), which generates images that simultaneously provide high resolution and a wide field of observation (entire tissue sections) in conjunction with morphometric evaluations, we detected, for example, that 60% of all inflammatory cells within a NE type granuloma, which is very rich in inflammatory cells, are eosinophils (Amaral *et al.*, 2017b). These and other immune cells such as macrophages, neutrophils and lymphocytes are sequentially recruited to form granulomas and once at the sites of infection, arrange as tightly clustered populations (Chuah *et al.*, 2014a).

While great consideration has been given to the collection of inflammatory cells and their repertoire of secreted cytokines during the development of schistosomal granulomas, less attention has been paid to other cells and extracellular material that compose these structures as well as their spatial organization. Lenzi and colleagues have elegantly described particular aspects of hepatic schistosomal granulomas in mice. These authors demonstrated that cellular adhesion and sorting play an important role, creating different zones within the mature granuloma where different types of cells tightly combine to form a well-delimited internal layer (peri-ovular) enveloped by paracentral and external layers (Lenzi *et al.*, 1999b). Myofibroblasts and hepatic stellate cells (HSCs) gradually produce a large amount of ECM fibers with two different collagen populations appearing successively and evolving to a final compact and concentric arrangement (Lenzi *et al.*, 1999b). Elastic fibers also define different topographic areas within the granuloma (Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006).

From a holistic point of view, schistosomal hepatic granulomas are therefore extremely complex and organized systems extraordinarily built to circumvent the parasite egg (Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006). Considering that *S. mansoni* eggs within the host tissues are viable and metabolically active, the hepatic granuloma function goes far beyond just attacking the miracidium (larva living inside the egg), but rather protecting host tissues by isolating toxins released from the eggs (Hams *et al.*, 2013a; Schwartz e Fallon, 2018). The spatial, organizational and functional features of the hepatic schistosomal granuloma brought us a new view of this biological system as a true ecosystem as discussed below.

4.3.1 THE SCHISTOSOMAL GRANULOMA AS AN ECOSYSTEM

Ecosystem is a biological organization that includes flows of energy and matter and interactions between biotic (living) and abiotic (non-living) components (Odum, 1966; Ulanowicz, 1972; Patten e Odum, 1981). The schistosomal granuloma holds many parallels to ecosystems and several similarities may be applied. Dominant paradigms that have guided this new view are associated with (1) flows of energy and (2) cycling of matter, requirements needed by all life forms (Odum, 1966; Patten e Odum, 1981; Morowitz e Smith, 2007; Buonocore *et al.*, 2019). In this context, the schistosomal granuloma can be understood as an interactive ecosystem, formed by cells (biotic component), protein scaffolds, fibers and chemical compounds (abiotic components) with inputs/outputs of energy and matter, as complex as classical ecosystems such as forests.

Ecological concepts are fundamentally multidimensional in nature (Alley, 1982; Jordán e Scheuring, 2004). The numbers of elements (cells, signaling molecules and matrix components) that interact to build a granuloma are so many that its global behavior can only be understood as an emerging consequence derived from the integral sum of all range of the cooperative phenomena (Lenzi e Romanha, 2003; Lenzi *et al.*, 2004). Hepatic granulomas of infected mice can reach a population of more than 40,000 cells (the sum of migrated and resident cells) working in an integrated way upon a platform of extremely structured ECM, and orchestrated by a

plethora of internally secreted products (Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006). In fact, the granuloma is consistently modulated by internal conditions and regulations (Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006). These authors demonstrated that the schistosomal granuloma satisfies characteristics of complex systems, such as dynamism; reconstruction; homeostasis and self-organization (Lenzi e Romanha, 2003). The same parameters are frequently applied to ecosystems in nature (Kay, 1991; Brulisauer *et al.*, 1996; Levin, 1998; Wagendorp *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2019) and, likewise, granulomas work as spatial units determined by particular arrangement of their ECM products, showing well-defined boundaries and providing a mechanical scaffold for adhesion, differentiation and migration of distinct cell populations (El-Meneza *et al.*, 1989; Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006) (Figure 2).

Although the hepatic granuloma is generally an avascular structure (occasionally show vessels in its periphery), there are flows and cycling of cells and other elements. In fact, the granuloma is not a tangled web of individual cells and fibers, but an organized structure, where the 3D arrangement of its fibers originating from fiber radiation centers serves to provide increased tissue integrity and efficient distribution of soluble compounds (growth factors and cytokines) which are the resources that cells need to perform their functions and to move (Lenzi *et al.*, 1999b; Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006). A large amount of signaling molecules diffuse within the granuloma matrix resulting in a flow of messages among cell populations, which constitute real networks or circuits (Patten e Odum, 1981; Lenzi *et al.*, 1991; Wynn e Cheever, 1995; Brunet *et al.*, 1999). These molecules also include egg products, which in turn lead to the recruitment of immune cells towards the antigenic stimuli (Boros e Warren, 1970; Lundy *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2018).

Therefore, it is clear that the environmental structure as well as dynamic events of input (migration and local proliferation) and output (apoptosis, necrosis) of cells pose the granuloma as an integrative site for communities of cells with inputs and outputs of matter and energy, thus characterizing a large ecosystem.

4.3.2 GRANULOMA PRESENTS SEVERAL ECOLOGICAL NICHEs FOR DIFFERENT CELL POPULATIONS

A definition that was borrowed from ecological sciences to the fields of cell biology and pathology is the term “niche”, which describes a specialized biotic and abiotic requirements that allow s each cell population reside, grow, differentiate and divide where cells can reside, grow and differentiate (Morrison e Spradling, 2008; Pienta *et al.*, 2008; Kareva, 2015). The study of granuloma ecosystem characteristics, in time and space, as well as the interactions that occurs, allows access to the ecological niches of the different cell populations. The first work to use the niche concept applied to a biological system was published in the 1970’s (Schofield, 1978) and reviewed in 2008, when the term niche was proposed for hematopoietic stem cells, as a defined and limited anatomic site where stem cells could maintain, reproduce and possibly revert their phenotype (Papayannopoulou e Scadden, 2008). Since then, “niches” have been widely used to refer to local tissue microenvironments that maintain and regulate all kinds of stem cells (Lin, 2002; Morrison e Spradling, 2008; Maclean *et al.*, 2014; Prager *et al.*, 2019).

Granulomas formed in response to different pathogens have also been referred to as “niches”, or “pathological niches”, to picture these structures as compartmentalized regions where ongoing immune responses with cytokine release and cell activation can take place and not merely an inflammatory cell infiltrate (Yoneyama e Ichida, 2005; Ehlers e Schaible, 2012; Martin *et al.*, 2016). However, granulomas, from an ecological perspective are much more complex than compartments defined as “pathological niches”. Under the lens of an ecosystem, the term “niche” is viewed as a multidimensional composite, with different attributes of individuals or species and multifaceted interactions (Gray e Lowery, 1996). Ecological niches are frequently defined considering a combination of requirements that allow a population to survive and to grow in a given place (spatial niche or habitat), as well as in terms of the interactions that species can establish in the community level (Odum, 1959; Whittaker *et al.*, 1973; Kroes, 1977; Chase e Leibold, 2003). Inside the granuloma, the same type of cell constitutes a cell population and the group of cell populations composes a cellular community, which is tightly organized in a fibrous matrix, actively produced by other equally important cell

populations (resident cells). Therefore, as detailed in Table 1, different cell populations inhabit the hepatic schistosomal granuloma. From an “ecological niche” perspective, the granuloma is indeed not only the place where a community of cells can be found (spatial niche) but also the place in which functional activities of the community-combined populations underlined by multi-directional interactions among them and/or with the ECM, happen in an orchestrated way in response to microenvironmental gradients.














Cell community	Description	Main functions in granuloma	Refs.
 T-lymphocyte	Several T cell subpopulations: CD4+ effector T cells, CD4+ regulatory T cells, and CD8+ cytotoxic T cells. Frequently seen as small cells with a higher nucleus to cytoplasmic ratio	Recruitment of other inflammatory cells to granuloma sites. Maintenance of the granuloma structure during the development of the disease	(Ferrarini, Cadoni et al. 1980, Jankovic, Cheever et al. 1998)
 B-lymphocyte	Frequently seen as small cells with a higher nucleus to cytoplasmic ratio. It has a bigger mean size when comparing to T cells	Regulation of T cell functions, and consequent modulation of granulomatous inflammation	(Ferrarini, Cadoni et al. 1980, El-Cheikhi, Bonomo et al. 1998, Strokotov, Yurkin et al. 2009)
 Plasma cell	Eccentrically placed nucleus. Presence of abundant rough endoplasmic reticulum, usually flattened, in parallel configuration.	Antibody production, which reduces necrosis	(Von Lichtenberg, Erickson et al. 1973, Graham and Bernier 1975)
 Eosinophil	Bilobed nucleus, a rich population of cytoplasmic granules identified by the presence of a crystalloid core surrounded by a matrix	Release of cytokines to other cells helping to trigger responses against the pathogen. Closely related to egg destruction, mainly through MBP secretion	(Butterworth, Wassom et al. 1979, Metwali, Elliott et al. 1993, Rumbley, Sugaya et al. 1999, Spencer, Bonjour et al. 2014)
 Neutrophil	Polylobed nucleus and a cytoplasm with numerous granules, differentiated in three subtypes: azurophilic, specific or gelatinase containing granules	Release of cytokines which helps to trigger responses against the pathogen. Also shown to be able to destroy the egg shell	(Anwar, McKean et al. 1980, McLaren, McKean et al. 1981, Lenzi, Kimmel et al. 1998)
 Basophil	Polylobed nucleus, with strongly condensed chromatin below the nuclear membrane. Numerous granules in the cytoplasm with a relatively homogeneous, moderately dense, finely matrix	Production of effector molecules, contributing for protection against helminth infection, like Schistosomiasis. Important role on granuloma formation	(Dvorak, Nabel et al. 1982, Falcone, Pritchard et al. 2001, Eberle and Voehringer 2016)
 Mast cell	Large and spherical, with an eccentric and non-segmented nucleus. Numerous cytoplasmic protrusions are seen at the periphery of the cells. The most visible component in the cytoplasm are the large granules, which are rounded or oval with homogeneous shape	Closely related to fibrosis enhancement, and in the granuloma these cells stimulate hepatic stellate cells secretion	(Bloom and Haegermark 1965, Brito and Borojevic 1997)
 Macrophage	It usually has a wide cytoplasm containing phagocytic vacuoles and a highly convoluted cell surface. Besides a single and non segmented nucleus	Regulate fibrosis development and induce the production of inflammatory cytokines and regulate the initiation, maintenance, and resolution of chronic granuloma inflammation	(van Furth, Hirsch et al. 1970, Lukacs, Kunkel et al. 1993, Barron and Wynn 2011)
 Epithelioid cell	Modified macrophages. Flat cells with elongated nucleus, abundant cytoplasm with diffuse dyeing. It has a similar appearance to epithelial cells	Defines the typical granulomatous reaction. There is still a discussion about its functions on granuloma, if its only secretory or if it keeps some phagocytic properties	(Sutton and Weiss 1966, Turk and Narayanan 1982, Turk 1989)
 Multinuclear giant cell	Possess three or more nucleus with uniform shape. The formation is started by fusion of cell membranes between macrophages or between epithelioid cells	Enhances phagocytic abilities and particle degradation, for their higher membrane disponibility and for having greater amounts of degradative enzymes, compared to macrophages	(Van Furth, Cohn et al. 1972, Adams 1976, Pagán and Ramakrishnan 2018)
 Hepatic stellate cell	Presents prominent dendritic cytoplasmic processes and numerous lipid bodies	Related to immune cell recruitment, contributing to granuloma formation, and are closely involved in collagen deposition.	(Friedman 2008, Carson, Ramm et al. 2018)
 Kupffer cell	Irregular cellular surface with elongated cytoplasmic processes that may extend along or below the endothelium. Nucleus with an almost rectangular appearance in some sections. Presence of a large rough endoplasmic reticulum	Liver resident macrophages. Might play a hole on granuloma formation, ancting in a simmlar way to macrophages	(Wake, Decker et al. 1989, Naito, Hasegawa et al. 2004)
 Fibroblast	Nucleus and cell body is typically elongated, with distinct narrow cell processes. Has a flattened shape	These cells synthesize extracellular matrix components	(Johnson, Friedman et al. 1971, Wylter, Wahl et al. 1981)

Table 1: Hepatic granuloma cell populations: characteristics and functions

4.4 INTEGRATED CELL POPULATIONS INHABIT GRANULOMAS

Cell populations in a murine hepatic schistosomal granuloma show distinct morphological characteristics and play different roles for maintenance/functioning of the granuloma as a whole (Table 1). The existence of varied cell populations forms a specialized cell community that demands coexistence of cells with similar life habits and resource needs comparable, by definition, to an ecosystem (Mcnaughton, 1973).

Granulomas, in general, are not typically composed of cell types at equal abundances, which are similar to species in a community, where there are a few abundant “common” species and many less abundant “rare” species, describing a lognormal abundance distribution curve (Krebs, 1989). In this sense, considering the community of immune cells within the hepatic murine granuloma, eosinophils, as noted, contribute with 60-70% (Moore *et al.*, 1977; Amaral *et al.*, 2017b), whereas neutrophil numbers are less than 10% (Moore *et al.*, 1977) and macrophages ~30% (reviewed in (Chuah *et al.*, 2014a). The occurrence and frequency of inflammatory cell populations change within the evolutionary stages of hepatic schistosomal granulomas. Thus, the cell density of eosinophils, for example, decreases progressively with the progress of the granulomatous process (Lenzi, Sobral, *et al.*, 1987).

Populations of immune cells in hepatic schistosomal granulomas communicate with each other by secreting immune mediators and other molecules, such as cytokines, chemokines and growth factors (Kubota *et al.*, 2004; Barron e Wynn, 2011; Chuah *et al.*, 2014a; Pagán e Ramakrishnan, 2018). For example, T lymphocytes release tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which attracts macrophages towards the granuloma (Pagán e Ramakrishnan, 2018). In turn, macrophages can produce MMP9, a factor that induces apoptosis of HSCs (Wynn e Barron, 2010), which might modulate granuloma fibrosis. HSCs produce stem cell factor (SCF), what is fundamental for mast cell maturation and activation, and this secretion can be stimulated by TNF- α released by mast cells themselves (Brito e Borojevic, 1997). B-lymphocytes are known to regulate granuloma formation, reducing its exacerbation, and this can happen in part by B-cell secretion of interleukin (IL)-12, which, in turn, regulates T-lymphocytes action (Wynn e Cheever, 1995; Jankovic *et al.*, 1998). Therefore, a plethora of cell interactions are taking place

as a complex network, although in what extent each cell population acts within the granuloma remains to be established. Indeed, one problem to fully understand the role of inflammatory cells acting in the granuloma relies on the fact that different cell populations work in an integrated way as an ecosystem and investigations are conducted, in general, on a determined cell population, which may not reflect the whole system.

Another indication that immune cells constitutes an integrated cell community is the fact that the presence or absence of one cell population may affect the functional role and the dominance of another, or influence the overall service that the community provides to the system (Wootton e Emmerson, 2005). B cells-knockout mice show a higher granulomatous inflammation (Jankovic *et al.*, 1998), relating this cell type to a populational control within the granuloma. In contrast, depletion of basophils reduces granuloma formation and size (Anyan *et al.*, 2013). Early studies with athymic mice established the necessity of T cells for granuloma development (Hsü *et al.*, 1976; Phillips *et al.*, 1977). In fact, the schistosome egg-induced immunopathology is believed to rely on the function of lymphocyte T population, especially CD4+ T cell (reviewed in (Chuah *et al.*, 2014a). On the other hand, other lymphocyte subpopulations, including CD8+ T cells and $\gamma\tau$ T cells, as well as eosinophils, have less clear functions (Yap *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 2004; Swartz, Dyer, Cheever, Ramalingam, Pesnicak, Domachowske, Lee, Lee, Foster, Wynn, *et al.*, 2006). Although eosinophils constitute a major population in the granuloma, it remains uncertain if these cells act as effector cells against the parasite; immunomodulators of the immune response; participants in tissue homeostasis and metabolism, or merely as operators in remodeling and clearance of debris (Lenzi, Lenzi, *et al.*, 1987; Meeusen e Balic, 2000; Swartz, Dyer, Cheever, Ramalingam, Pesnicak, Domachowske, Lee, Lee, Foster, Wynn, *et al.*, 2006; Cadman e Lawrence, 2010; Huang e Appleton, 2016; Tweyongyere *et al.*, 2016; Dias, Amaral, Malta, Silva, Rodrigues, Rosa, Rodrigues, Costa, *et al.*, 2018).

Cells within granulomas also express multiple adhesion molecules that are equally important to the structure and functioning of the entire granuloma, keeping the cell community together and in communication (Jacobs *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 1999; Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006; Figliuolo Da Paz *et al.*, 2019). The spatial distribution of these molecules within hepatic granulomas enables a concentric

organization of the cell populations according a thermodynamic model of cellular interaction (Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2008). This model predicts that mixed cells interact to form an assemblage with the lowest interferential free energy (= configuration in which the number of cell-to-cell links is maximized). This means that cells organize themselves to acquire a more stable thermodynamic pattern. Cells do not randomly sort themselves, but flows actively to generate distinct and well-defined layers (Lenzi *et al.*, 2008). For example, in mature hepatic granulomas, the macrophage population migrates centripetally to the periovular region while other cell populations, such as eosinophils and fibroblasts, are positioned in the peripheral and paracentric layers of the granuloma (Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006; Lenzi *et al.*, 2008).

Altogether, when the granuloma is seen and understood from a global perspective, what it is clear is that its functionality depends on the whole community with co-participation of distinct cell populations analogous to all ecosystems, where species interact with each other.

4.5 COLONIZATION OF CELL COMMUNITIES DURING GRANULOMA FORMATION: AN ECOLOGICAL SUCCESSION?

A central question to better understand schistosomiasis mansoni is how the community of cells colonizes the hepatic tissue to form granulomas? This might be explained from the point of view of an “ecological succession” (Figure 1), process whereby a community is able to modify the physical environment, including a “secondary succession”, which begins at a location previously occupied by another community (Odum, 1966; Horn, 1974). The primary hepatic tissue community is composed of parenchymal cells (hepatocytes), non-parenchymal cells (liver sinusoidal endothelial cells and portal fibroblasts) and resident liver cells (HSCs and Kupffer cells) (Table 1)(Anthony *et al.*, 2012). After parasite’s egg deposition in the liver, hepatocytes start to die due to toxic products released by the eggs (soluble egg antigens - SEAs). Hepatocytes are then focally replaced by infiltrating macrophages and lymphocytes chemoattracted by SEAs (Lenzi *et al.*, 2008; Lins, R. A. *et al.*,

2008). Subsequently, the process of secondary succession takes place comparable to what happens in areas of deforested or burned forests or in abandoned crop fields (Lemon, 1949; Odum, 1966; Bazzaz e Pickett, 1980).

During forest formation, pioneer species are the first to colonize the environment. They have high growth rates and small size such as mosses and grasses (Clements, 1916; Horn, 1974) (Figure 1). Macrophages and lymphocytes can be considered as pioneer cell populations, since they are the first “cell species” to colonize the granuloma site. These cells play an important role on the recruitment of other inflammatory populations including additional T cells, B cells, plasma cells, eosinophils, mast cells, neutrophils, basophils and other macrophages (Phillips *et al.*, 1977; Rossi *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2001; Pagán e Ramakrishnan, 2018).

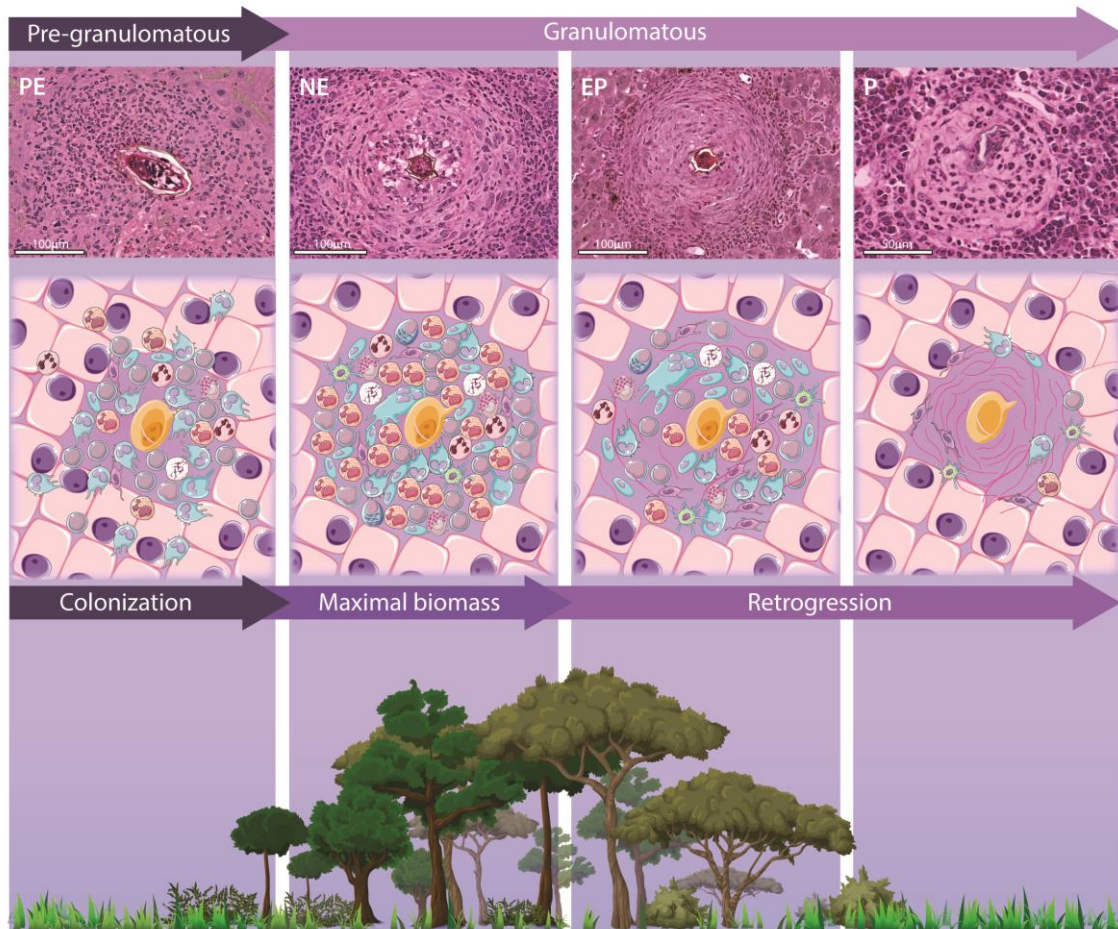


Figure 1 – Ecology succession in granuloma formation. The succession process in hepatic granuloma begins with a secondary succession, which occurs in previously inhabited environments that have suffered some impact (like burned and pasture in forests environments). In this case the impact is the arrival of the metabolically active parasite egg in hepatic tissue. The hepatic granuloma has a pre- granulomatous stage PE and granulomatous stages (NE, EP and P). The granulomatous stages characterizes the beginning of retrogressive succession, resulting from the depletion of nutrients and consequent decrease of biomass, as well as occurs in forest environments. PE: pre-granulomatous exudative granuloma verge the beginning of granuloma. Featured by an inflammatory cells infiltrate in process of organization around the parasite egg; NE: necrotic exudative granuloma: identified by a central halo of necrosis and numerous inflammatory cells distributed irregularly on subsequent layers EP exudative-productive granuloma, the main organized granuloma showing a more circumferential aspect, characterized by a rich structure of collagen fibers and inflammatory cells concentrated in the granuloma periphery. It marks the beginning of retrogression of the hepatic granuloma; P: productive granuloma, an involutive reaction with a typical thick band of collagen fibers between the egg and few numbers of inflammatory cells. The cells shown in the scheme refer to table 1.

As noted, the granuloma construction occurs under dynamic and intricate cell-cell and cell-matrix interactions, with release of diverse cytokines, chemokines, growth factors and ECM compounds (Bentley *et al.*, 1982; Borojevic, 1992; Lenzi *et al.*, 1998; Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006). As a succession process happening in a forest ecosystem, the cell community within a granuloma modifies, at certain time frames, its cellular and molecular composition as well as its spatial structure. Thus, numbers and types of cells; constituents and arrangement of the ECM, including types of collagen fibers (from type I to type III) and glycosaminoglycan content; and diffusion rate of secreted molecules change in the granuloma ecosystem (El-Meneza *et al.*, 1989; Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2008; Lenzi *et al.*, 2008). For example, the earliest hepatic granulomas form in a Th1 environment with downregulation of Th1 and upregulation of Th2 responses nearly six weeks after infection (Cheever *et al.*, 1998). This switch of cytokine predominance is likely related with changes in the populational composition/proportion along evolutionary phases of hepatic granuloma. Therefore, the environment alterations propitiate modulation of responses following incoming, raise or predominance of populations in the granuloma context. The lymphocyte population, for example, regulates specific production of cytokines that in turn trigger suppressor activities via histamine receptors, likely produced by mast cells (Weinstock e Blum, 1987). The population of mast cells inside hepatic granulomas in mice shows a cyclic behavior emerging at 40 days of infection and reaching high proportion at 80 and 160 days of infection (Lenzi, Sobral, *et al.*, 1987; Lenzi *et al.*, 1998).

The early phase of schistosomiasis is followed by recruitment and activation of cells such as fibroblasts, myofibroblasts and HSCs, leading to the production of ECM and collagen fibers that form an additional layer at the outer zone of the granuloma area. The ECM is dynamically produced and reabsorbed after its degradation. In its construction, the granuloma develops a variable and irregular collagenic topology, originated bidirectionally of centrifugal and centripetal assemblages from units of collagen growth, defining a fractal pattern (Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006). During the EP stage of granulomas, the self-assembly of these fibers minimizes energy and mass through continuous tension and focal compression (Lenzi *et al.*, 1999b). The 3D architecture of granulomas thus provides increased tissue integrity,

efficient distribution of soluble compounds and an efficient background for directional cell movement (haptotaxis) (Lenzi *et al.*, 1999b; Lenzi, Romanha Wde, *et al.*, 2006).

During its final stages, the granuloma is significantly reduced in size and in proportion of cell populations (Lenzi *et al.*, 1998; Burke *et al.*, 2009). Following the miracidium death within the egg, the granuloma structure disintegrates and calcifies, and this is associated with a reduction in the inflammatory response. From an ecological point of view, this resolution phase is corresponding to what occurs in plant succession, where initial stages are characterized by a progressive accumulation of plant biomass followed by a retrogressive phase, represented by the increase and decrease in number and populational richness, respectively. The retrogression in plant ecosystems can be related with lack of space and resources (Peltzer *et al.*, 2010; Walker e Wardle, 2014), situations also found in granulomas at late stages.

Finally, hepatic granuloma formation may be perfectly adjusted to the concept of “structured chaos” since it evolves from an initial disordered phase (pre-granulomatous stage) to a highly organized cell assembly (granulomatous stage). In this perspective, the granuloma has two sequential evolutionary phases: a neocentric (which denies entropy), of evolution and creation, and another entropic, of decay and dissolution, events that may characterize the climax reached by the granuloma in its “succession” as classically discussed for ecosystems (Clements, 1916; Whittaker, 1953).

4.6 CONCLUDING REMARKS

Ecological perspectives are not limited just to one spatial scale and may be applied to cells and genes. Parallel views between ecology and cell biology/immunology have been increasingly used in order to better understand cell behavior and its responses and interactions (Gatenby, 1991; Wassom, 1993; Papayannopoulou e Scadden, 2008; Amend *et al.*, 2016; Steidl, 2017). In cancer biology, for instance, the microenvironment has been considered a significant factor

that participates in the control of the biological properties of tumors (Sutherland, 1988; Ariztia *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2012; Prager *et al.*, 2019).

What can we learn when we change our current view of schistosomal granulomas from just a histopathological finding to active ecosystems? What emerges is that, in light of a global view, in which different cell populations act in an integrated way underlined by ecological precepts, attention is directed to events/behaviors that may be central to the disease biology thus enabling adequate treatment/control. Cells within a hepatic granuloma establish interactions with each other and with the granuloma microenvironment. As species in a classical ecosystem, these cell populations thus need to be considered as a community and not seen just from an individual perception. Future evaluations of granulomas elicited by *S. mansoni* infection in an ecological perspective will pave the way for better understanding of this disease thus enabling adequate treatment/control

4.7 REFERENCES

ALLEY, T. R. Competition theory, evolution, and the concept of an ecological niche. **Acta Biotheoretica**, v. 31, n. 3, p. 165-179, 1982. ISSN 0001-5342.

AMARAL, K. B. et al. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0184696, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28902908> >.

AMARAL, K. B. et al. Natural *Schistosoma mansoni* Infection in the Wild Reservoir *Nectomys squamipes* Leads to Excessive Lipid Droplet Accumulation in Hepatocytes in the Absence of Liver Functional Impairment. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0166979, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic)1932-6203(Linking). Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27880808> >.

AMEND, S. R. et al. Ecological paradigms to understand the dynamics of metastasis. **Cancer Letters**, v. 380, n. 1, p. 237-242, 2016. ISSN 0304-3835.

ANDERSON, L. A.; CHEEVER, A. W. Comparison of geographical strains of *Schistosoma mansoni* in the mouse. **Bull World Health Organ**, v. 46, n. 2, p. 233-42, 1972. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4537484> >.

ANTHONY, B. J.; RAMM, G. A.; MCMANUS, D. P. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 12, p. 572-579, 2012. ISSN 1471-4922.

ANYAN, W. K. et al. Basophil depletion downregulates *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation. **Parasitology International**, v. 62, n. 6, p. 508-513, 2013. ISSN 1383-5769.

ARIZTIA, E. V. et al. The tumor microenvironment: key to early detection. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 43, n. 5-6, p. 393-425, 2006. ISSN 1040-8363 (Print) 1040-8363 (Linking).Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050079> >.

BARRON, L.; WYNN, T. A. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 9, p. 2509-2514, 2011. ISSN 0014-2980.

BAZZAZ, F. A.; PICKETT, S. T. A. Physiological ecology of tropical succession: a comparative review. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 11, n. 1, p. 287-310, 1980. ISSN 0066-4162.

BENTLEY, A. G.; DOUGHTY, B. L.; PHILLIPS, S. M. Ultrastructural analysis of the cellular response to *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 6, p. 1168-1180, 1982. ISSN 0002-9637.

BOROJEVIC, R. Experimental murine schistosomiasis mansoni: establishment of the chronic phase of the disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87 Suppl 4, p. 171-4, 1992. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1343890> >.

BOROS, D. L.; WARREN, K. S. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, n. 3, p. 488-507, 1970. ISSN 0022-1007.

BRITO, J. M.; BOROJEVIC, R. Liver granulomas in schistosomiasis: mast cell-dependent induction of SCF expression in hepatic stellate cells is mediated by TNF- α . **Journal of Leukocyte Biology**, v. 62, n. 3, p. 389-396, 1997. ISSN 1938-3673.

BRULISAUER, A. R.; BRADFIELD, G. E.; MAZE, J. Quantifying organizational change after fire in lodgepole pine forest understorey. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, n. 11, p. 1773-1782, 1996. ISSN 0008-4026.

BRUNET, L. R. et al. Interleukin 5 (IL-5) is not required for expression of a Th2 response or host resistance mechanisms during murine schistosomiasis mansoni but does play a role in development of IL-4-producing non-T, non-B cells. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 3014-3018, 1999. ISSN 0019-9567.

BUONOCORE, E. et al. Modeling matter and energy flows in marine ecosystems using emergy and eco-exergy methods to account for natural capital value. **Ecological Modelling**, v. 392, n. 1, p. 137-146, 2019. ISSN 0304-3800.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 163-176, 2009. ISSN 1365-3024.

CADMAN, E. T.; LAWRENCE, R. A. Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection?. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 1, p. 1-19, Jan 2010. ISSN 1365-3024 (Electronic)0141-9838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042003> >.

CHASE, J. M.; LEIBOLD, M. A. **Ecological Niches: Linking Classical and Contemporary Approaches**. University of Chicago Press, 2003. ISBN 0226101800.

CHEEVER, A. W. et al. Role of cytokines in the formation and downregulation of hepatic circumoval granulomas and hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93 Suppl 1, p. 25-32, 1998. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9921320> >.

CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 141-50, Mar 2014.

ISSN 1471-5007 (Electronic) 1471-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24433721> >.

CLEMENTS, F. E. **Plant succession: an analysis of the development of vegetation**. Carnegie Institution of Washington, 1916.

DIAS, F. F. et al. Identification of Piecemeal Degranulation and Vesicular Transport of MBP-1 in Liver-Infiltrating Mouse Eosinophils During Acute Experimental *Schistosoma mansoni* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3019, 2018. ISSN 1664-3224 (Electronic)1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30619361> >.

CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: Uma Visão Multidisciplinar**. Scielo-Editora FIOCRUZ, 2008. ISBN 8575413708.

EHLERS, S.; SCHAIBLE, U. E. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 411, 2012. ISSN 1664-3224 (Electronic) 1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23308075> >.

EL-MENEZA, S. et al. Dynamics of hepatic connective tissue matrix constituents during murine *Schistosoma mansoni* infection. **Hepatology**, v. 9, n. 1, p. 50-6, Jan 1989. ISSN 0270-9139 (Print)0270-9139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2535698> >.

FIGLIUOLO DA PAZ, V. R.; FIGUEIREDO-VANZAN, D.; DOS SANTOS PYRRHO, A. Interaction and involvement of cellular adhesion molecules in the pathogenesis of Schistosomiasis mansoni. **Immunology Letters**, v. 206, p. 11-18, Feb 2019. ISSN 1879-0542 (Electronic) 0165-2478 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30503821> >.

GATENBY, R. A. Population ecology issues in tumor growth. **Cancer Research**, v. 51, n. 10, p. 2542-2547, 1991. ISSN 0008-5472.

GRAY, V.; LOWERY, D. A niche theory of interest representation. **The Journal of Politics**, v. 58, n. 1, p. 91-111, 1996. ISSN 0022-3816.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The schistosoma granuloma: friend or foe? **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 89, 2013. ISSN 1664-3224 (Electronic)1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23596444> >.

HORN, H. S. The ecology of secondary succession. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 5, n. 1, p. 25-37, 1974. ISSN 0066-4162.

HSÜ, C. K. et al. Immunopathology of schistosomiasis in athymic mice. **Nature**, v. 262, n. 5567, p. 397, 1976. ISSN 1476-4687.

HSU, S. Y. et al. Comparative studies on the lesions caused by eggs of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in livers of albino mice and rhesus monkeys. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 66, n. 1, p. 89-97, Mar 1972. ISSN 0003-4983 (Print)0003-4983 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4623247> >.

HUANG, L.; APPLETON, J. A. Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 10, p. 798-807, Oct 2016. ISSN 1471-5007 (Electronic)1471-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27262918> >.

JACOBS, W. et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocytefunction-associated antigen-1 in experimental *Schistosoma mansoni* infection and in synchronous periparticular hepatic granulomas in mice: immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy, and immunoelectron microscopy. **Parasitology Research**, v. 83, n. 5, p. 405-412, 1997. ISSN 0932-0113.

JACOBS, W.; DEELDER, A.; VAN MARCK, E. Schistosomal granuloma modulation. II. Specific immunogenic carbohydrates can modulate schistosome-egg-antigen-induced hepatic granuloma formation. **Parasitology Research**, v. 85, n. 1, p. 14-18, 1999. ISSN 0932-0113.

JANKOVIC, D. et al. CD4+ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 4, p. 619-29, Feb 16 1998. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking).Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9463412> >.

JORDÁN, F.; SCHEURING, I. Network ecology: topological constraints on ecosystem dynamics. **Physics of Life Reviews**, v. 1, n. 3, p. 139-172, 2004. ISSN 1571-0645.

KAREVA, I. Cancer ecology: Niche construction, keystone species, ecological succession, and ergodic theory. **Biological Theory**, v. 10, n. 4, p. 283-288, 2015. ISSN 1555-5542.

KAY, J. J. A nonequilibrium thermodynamic framework for discussing ecosystem integrity. **Environmental Management**, v. 15, n. 4, p. 483-495, 1991. ISSN 0364-152X.

KREBS, C. J. **Ecological Methodology**. Harper & Row New York, p.654. 1989

KROES, H. W. The niche structure of ecosystems. **Journal of Theoretical Biology**, v. 65, n. 2, p. 317-326, 1977. ISSN 0022-5193.

KUBOTA, H.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 3, p. 722-31, Sep 2004. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking).

Disponível:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15115718 >.

LEMON, P. C. Successional responses of herbs in the longleaf-slash pine forest after fire. **Ecology**, v. 30, n. 2, p. 135-145, 1949. ISSN 1939-9170.

LENZI, H. L. et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 141-151, 1998. ISSN 0074-0276.

LENZI, H. L. et al. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 32, n. 5, p. 639-43, May 1999. ISSN 0100-879X (Print)0100-879X (Linking).Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10412576> >.

LENZI, H. L. et al. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 77-90, 1991. ISSN 0074-0276.

LENZI, H. L.; LENZI, J. A.; SOBRAL, A. C. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 20, n. 3-4, p. 433-5, 1987. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3132213> >.

LENZI, H. L. et al. Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: fractal arrangement, internal regulation, autopoietic component and closure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 219-31, Sep 2006. ISSN 0074-0276 (Print)0074-0276 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308773> >.

LENZI, H. L.; ROMANHA, W. S. **Schistosomal granuloma is like a small multicellular organism that operates as a complex system.** 2003.

LENZI, H. L.; ROMANHA, W. S.; PELAJO-MACHADO, M. Possíveis níveis de complexidade na modelagem de sistemas biológicos Pode a matemática coreografar a dança biológica? In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE MATEMÁTICA APLICADA E COMPUTACIONAL, S. C., SP (Ed.). **Notas em Matemática Aplicada: Modelagem em Biomatemática**, 2004. p. 54-78

LENZI, H. L. et al. **Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico.** 2008. 569-654.

LENZI, H. L.; SOBRAL, A. C. L.; LENZI, J. A. In vivo kinetics of eosinophils and mast cells in experimental murine schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 1, p. 67-76, 1987. ISSN 0074-0276.

LEVIN, S. A. Ecosystems and the biosphere as complex adaptive systems. **Ecosystems**, v. 1, n. 5, p. 431-436, 1998. ISSN 1432-9840.

LIN, H. The stem-cell niche theory: lessons from flies. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 12, p. 931, 2002. ISSN 1471-0064.

LINS, R. A. et al. Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 173-8, Mar-Apr 2008. ISSN 0037-8682 (Print)0037-8682 (Linking).Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18545839> >.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 4, p. 395-406, 2012. ISSN 0021-9525.

LUNDY, S. K.; LERMAN, S. P.; BOROS, D. L. Soluble egg antigen-stimulated T helper lymphocyte apoptosis and evidence for cell death mediated by FasL+ T and B cells during murine *Schistosoma mansoni* infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 271-280, 2001. ISSN 0019-9567.

MACLEAN, A. L.; FILIPPI, S.; STUMPF, M. P. The ecology in the hematopoietic stem cell niche determines the clinical outcome in chronic myeloid leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 111, n. 10, p. 3883-8, Mar 11 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking).Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24567385> >.

MARTIN, C. J.; CAREY, A. F.; FORTUNE, S. M. A bug's life in the granuloma. **Seminar in Immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 213-20, Mar 2016. ISSN 1863-2300 (Electronic) 1863-2297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26577238> >.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 13, Aug 9 2018. ISSN 2056-676X (Electronic) 2056-676X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30093684> >.

MCNAUGHTON, S. J. **General Ecology**. 1973. ISBN 0030862183.

MEEUSEN, E. N.; BALIC, A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? **Parasitology Today**, v. 16, n. 3, p. 95-101, Mar 2000. ISSN 0169-4758 (Print) 0169-4758 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10689327> >.

MILLER, P. W.; MOTE, T. L.; RAMSEYER, C. A. An empirical study of the relationship between seasonal precipitation and thermodynamic environment in Puerto Rico. **Weather and Forecasting**, 2019.

MOORE, D. L.; GROVE, D. I.; WARREN, K. S. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. **The Journal of Pathology**, v. 121, n. 1, p. 41-50, 1977. ISSN 0022-3417.

MOROWITZ, H.; SMITH, E. Energy flow and the organization of life. **Complexity**, v. 13, n. 1, p. 51-59, 2007. ISSN 1076-2787.

MORRISON, S. J.; SPRADLING, A. C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 598-611, 2008. ISSN 0092-8674.

ODUM, E. P. **Fundamentals of Ecology**. WB Saunders company, 1959.

ODUM, E. P. The strategy of ecosystem development. **Science**, v. 164, n. 262.270, 1966.

PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. The formation and function of granulomas. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 639-665, 2018. ISSN 0732-0582.

PAPAYANNOPOULOU, T.; SCADDEN, D. T. Stem-cell ecology and stem cells in motion. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3923-3930, 2008. ISSN 0006-4971.

PATTEN, B. C.; ODUM, E. P. The cybernetic nature of ecosystems. **The American Naturalist**, v. 118, n. 6, p. 886-895, 1981. ISSN 0003-0147.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews in Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499-511, Jul 2002. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12094224> >.

PELTZER, D. A. et al. Understanding ecosystem retrogression. **Ecological Monographs**, v. 80, n. 4, p. 509-529, 2010.

PHILLIPS, S. M. et al. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse: I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation, and host morbidity. **The Journal of Immunology**, v. 118, n. 2, p. 594-599, 1977. ISSN 0022-1767.

PIENTA, K. J. et al. Ecological therapy for cancer: defining tumors using an ecosystem paradigm suggests new opportunities for novel cancer treatments. **Translational Oncology**, v. 1, n. 4, p. 158-164, 2008. ISSN 1936-5233.

PRAGER, B. C. et al. Cancer Stem Cells: The Architects of the Tumor Ecosystem. **Cell Stem Cell**, v. 24, n. 1, p. 41-53, Jan 3 2019. ISSN 1875-9777 (Electronic) 1875-9777 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30609398> >.

RASO, P. et al. *Schistosoma mansoni* granuloma in late evolutive phase, in a case of tumoral form in man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 627-32, Oct 2012. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152348> >.

REIS, L. F. et al. Quantitative and qualitative interferences of pentoxifylline on hepatic *Schistosoma mansoni* granulomas: effects on extracellular matrix and eosinophil

population. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 107-112, 2001. ISSN 0074-0276.

ROSSI, M. I. D. et al. Extramedullar B lymphopoiesis in liver schistosomal granulomas: presence of the early stages and inhibition of the full B cell differentiation. **International Immunology**, v. 11, n. 4, p. 509-518, 1999. ISSN 1460-2377.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. **Blood cells**, v. 4, n. 1-2, p. 7-25, 1978. ISSN 0340-4684.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. Schistosoma "Eggs-Itting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2492, 2018. ISSN 1664-3224 (Electronic) 1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30459767> >.

STADECKER, M. J.; WRIGHT, J. A. Distribution and kinetics of mononuclear phagocytes in granulomas elicited by eggs of *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Pathology**, v. 116, n. 2, p. 245, 1984.

STEIDL, C. The ecosystem of classical Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 130, n. 22, p. 2360-2361, 2017. ISSN 0006-4971.

SUTHERLAND, R. M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. **Science**, v. 240, n. 4849, p. 177-184, 1988. ISSN 0036-8075.

SWARTZ, J. M. et al. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. **Blood**, v. 108, n. 7, p. 2420-7, Oct 1 2006. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772607> >.

TWEYONGYERE, R. et al. Human eosinophils modulate peripheral blood mononuclear cell response to *Schistosoma mansoni* adult worm antigen in vitro. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 8, p. 516-22, Aug 2016. ISSN 1365-3024 (Electronic) 0141-9838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27169695> >.

ULANOWICZ, R. Mass Energy and Flow in closed ecosystems. **Journal of Theoretical Biology**, v. 34, p. 239-253, 1972. ISSN 0022-5193.

WAGENDORP, T. et al. Land use impact evaluation in life cycle assessment based on ecosystem thermodynamics. **Energy**, v. 31, n. 1, p. 112-125, 2006. ISSN 0360-5442.

WALKER, L. R.; WARDLE, D. A. Plant succession as an integrator of contrasting ecological time scales. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 29, n. 9, p. 504-510, 2014.

WASSOM, D. L. Immunoecological succession in host-parasite communities. **Journal of Parasitology**, v. 79, n. 4, p. 483-7, Aug 1993. ISSN 0022-3395 (Print) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8331469> >.

WEINSTOCK, J. V.; BLUM, A. M. Isolated liver granulomas of murine *Schistosoma mansoni* contain components of the angiotensin system. **Journal of Immunology**, v. 131, n. 5, p. 2529-32, Nov 1983. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6195268> >.

WEINSTOCK, J. V.; BLUM, A. M. Modulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni by enteric exposure to schistosome ova: in vitro characterization of a regulatory mechanism within the granuloma. **Cellular Immunology**, v. 108, n. 2, p. 452-459, 1987. ISSN 0008-8749.

WHITTAKER, R. H. A consideration of climax theory: the climax as a population and pattern. **Ecological monographs**, v. 23, n. 1, p. 41-78, 1953. ISSN 1557-7015.

WHITTAKER, R. H.; LEVIN, S. A.; ROOT, R. B. Niche, habitat, and ecotope. **The American Naturalist**, v. 107, n. 955, p. 321-338, 1973. ISSN 0003-0147.

WHO. **Schistosomiasis. World Health Organization. Progress report 2001–2011 and strategic plan 2012-2020.** 2011. 80 ISBN ISBN 978 92 4 150317 4.

WOOTTON, J. T.; EMMERSON, M. Measurement of interaction strength in nature. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 36, n. 1, p. 419-444, 2005. ISSN 1543-592X.

WYNN, T. A.; BARRON, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. **Seminars in Liver Disease**, v. 30, n. 3, p. 245-57, Aug 2010. ISSN 1098-8971 (Electronic) 0272-8087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20665377> >.

WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, n. 4, p. 505-511, 1995. ISSN 0952-7915.

XU, F. et al. Ecosystem health assessment of Baiyangdian Lake based on thermodynamic indicators. **Procedia Environmental Sciences**, v. 13, n. 1, p. 2402-2413, 2012. ISSN 1878-0296.

YAP, G. et al. Unimpaired down-modulation of the hepatic granulomatous response in CD8 T-cell-and gamma interferon-deficient mice chronically infected with *Schistosoma mansoni*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2583-2586, 1997. ISSN 0019-9567.

YONEYAMA, H.; ICHIDA, T. Recruitment of dendritic cells to pathological niches in inflamed liver. **Medical Molecular Morphology**, v. 38, n. 3, p. 136-141, 2005. ISSN 1860-1480.

5 CAPÍTULO 2- ASPECTOS DESCRITIVOS DA COMUNIDADE CELULAR DO GRANULOMA HEPÁTICO AO LONGO DE SUA EVOLUÇÃO DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EXPERIMENTAL

Neste capítulo, investigamos sob o ponto de vista da ecologia celular, aspectos da composição e estrutura da comunidade de células do granuloma hepático durante estágios evolutivos da esquistossomose mansônica experimental. Através da aplicação de técnicas qualitativas e quantitativas por WSI (*Whole Slide Imaging*), fizemos um estudo detalhado sobre a composição da comunidade celular ao longo da evolução do granuloma no fígado. Parâmetros clássicos para o estudo de comunidades em ecossistemas de maior escala foram aplicados pela primeira vez ao contexto do granuloma. Nossos resultados reforçam que as células nos granulomas podem se comportar com bastante similaridade às populações e comunidades de ecossistemas em escala maior.

5.1 INTRODUÇÃO

A característica histopatológica mais marcante da esquistossomose mansoni é o desenvolvimento de granulomas, agrupamentos bem definidos de células inflamatórias embutidas em uma matriz extracelular rica em colágeno em torno de ovos de parasitos maduros depositados nos órgãos-alvo, como fígado e intestino. O desenvolvimento de granulomas tem sido extensivamente estudado no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* (Anderson e Cheever, 1972a; Hsü *et al.*, 1972; Lenzi *et al.*, 1998; Lenzi *et al.*, 1999a; Swartz, Dyer, Cheever, Ramalingam, Pesnicak, Domachowske, Lee, Lee, Foster e Wynn, 2006; Amaral *et al.*, 2017a; Dias, Amaral, Malta, Silva, Rodrigues, Rosa, Rodrigues, Chiarini-Garcia, *et al.*, 2018). Em modelos murinos, mais de 50% dos ovos ficam presos nos vasos capilares sinusóides do fígado (Anderson e Cheever, 1972a).

Conforme discutido no Capítulo 1, o granuloma esquistossomótico é sistema interativo de células (componente biótico), proteínas, fibras e bioquímicos (componentes abióticos) com entradas/saídas de matéria e energia que pode ser tão complexo quanto um ecossistema em maior escala. Além disso, as populações

celulares em um granuloma esquistossomótico murino no fígado formam uma comunidade de células especializadas já que têm características morfológicas distintas e desempenham papéis diferentes para manutenção e/ou funcionamento do ecossistema do granuloma (Mcnaughton, 1973).

No presente capítulo, caracterizamos e quantificamos as populações de células presentes no granuloma hepático murino. Avaliamos também aspectos descritivos da comunidade celular nele presente. A identificação de populações de células que atuam como uma comunidade integrada no granuloma abre novas perspectivas de estudo a cerca do entendimento e evolução da esquistossomose. Além disso, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias para o tratamento da doença.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 ANIMAIS E INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster* (n=12) com aproximadamente 70 dias de idade foram infectados ou não com um único inóculo de cercárias de *S. mansoni* (100 cercárias/animal). A infecção foi realizada no laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia no departamento de parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde o ciclo de vida do *S. mansoni* (cepa LE/BH) é mantido rotineiramente. A infecção foi confirmada por achados de ovos nas fezes dos camundongos na quinta semana de infecção.

5.2.2 EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS

Animais infectados (n=8) e controles (n=4) não infectados foram eutanasiados após 55 (n=4) e 115 dias (n=4) de infecção, que correspondem à fase aguda e crônica da doença (Dias, Amaral, Malta, Silva, Rodrigues, Rosa, Rodrigues, Chiarini-

Garcia, *et al.*, 2018). Os animais foram eutanasiados em câmara de CO² e, em seguida, fragmentos do fígado de camundongos controle e infectados foram imediatamente fixados em solução de paraformaldeído a 4% e mantidos *overnight* a 4°C. No dia seguinte, os fragmentos foram transferidos para uma solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 até o processamento para análise histológica.

5.2.3 COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi realizado em total conformidade com todas as diretrizes éticas do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz/RJ (CEUA, # LW-32/2012). Animais experimentalmente infectados e controles foram monitorados diariamente para avaliações de sobrevivência e bem estar (avaliação da gaiola, condições de temperatura, fotoperíodo, lesões, motilidade e outras condições gerais). Nenhum animal veio a óbito antes do dia final de experimento.

5.2.4 INCLUSÃO EM RESINA

Os fragmentos de fígado (n=3 para cada animal) em blocos de resina glicolmetacrilato (GMA) conforme descrito anteriormente (Amaral *et al.*, 2017a; Dias, Amaral, Malta, Silva, Rodrigues, Rosa, Rodrigues, Chiarini-Garcia, *et al.*, 2018). Brevemente, seguiu-se a etapa de desidratação por 20 minutos cada. Após a desidratação em série crescente de alcoóis [70°, 80°, 90° e 100° (2 vezes)], a infiltração foi feita em duas sequências de resina GMA por 2 horas e *overnight*, respectivamente. No dia seguinte, os fragmentos foram retirados da 2ª resina e colocados cuidadosamente no fundo de forminhas próprias, onde a solução de inclusão foi acrescentada. As forminhas foram acondicionadas em recipiente gelado por 2 horas, a fim de evitar a retração do tecido. A polimerização foi finalizada em

até 2 dias em temperatura ambiente. Foi utilizada resina acrílica para colar os blocos aos suportes para a etapa seguinte de microtomia.

Ressalta-se que o processo de inclusão em GMA permite a coloração direta do material após a etapa de microtomia, dispensando as etapas de diafanização por xilol necessárias nos processos de inclusão convencionais. Por ser uma resina plástica à base de água, ela disponibiliza alta resolução das células e outros constituintes teciduais (Dias, Amaral, Malta, Silva, Rodrigues, Rosa, Rodrigues, Chiarini-Garcia, *et al.*, 2018).

5.2.5 MICROTOMIA E COLORAÇÃO

Secções de 3 µm de espessura foram obtidos utilizando-se navalha de vidro em micrótomo (Leica RM2155). Em seguida, os cortes histológicos foram colocados em lâminas de vidro e fixados à 60°C por 2 minutos. Três secções do fígado de cada animal infectado e controle foram obtidas com um intervalo de 300 µm entre uma secção e outra, para garantir que granulomas diferentes fossem analisados. Imediatamente, seguiu-se à etapa de coloração com Hematoxilina-Eosina (HE), conforme protocolo abaixo:

- a) solução mordente de alúmen de ferro a 2% por 10 minutos;
- b) água corrente por 5 minutos;
- c) hematoxilia de Harris por 30 segundos;
- d) água corrente por 10 minutos;
- e) diferenciação em álcool acidulado por 1:30 minutos;
- f) água corrente por 10 minutos;
- g) eosina aquosa por 30 segundos;
- h) água corrente até que o excesso de corante fosse retirado;
- i) secagem a temperatura ambiente;
- j) montagem da lâmina com Entellan®.

A etapa de coloração foi realizada com auxílio de suporte de lâminas, pingando-se as soluções até que cobrissem os cortes por inteiro. Ressalta-se que o corante foi envelhecido por pelo menos 1 mês antes da etapa de coloração.

5.2.6 ANÁLISE DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS POR "*Whole Slide Imaging*" (WSI)

Após a montagem de lâminas permanentes com Entellan®, as análises dos granulomas e das populações celulares componentes foram realizadas por *whole slide imaging* (WSI). Esta técnica consiste na digitalização das lâminas, que gera uma imagem em alta resolução da área total dos cortes histológicos e permite a aplicação de softwares para análises qualitativas, quantitativas e morfométricas precisas (Al-Janabi *et al.*, 2012; Cornish *et al.*, 2012; Fónyad *et al.*, 2012). Análises de WSI tem se mostrado uma ferramenta eficiente e precisa para avaliação da distribuição, tamanho e estágios evolutivos de granulomas esquitossomóticos em diferentes modelos de animais (Amaral, Kátia B *et al.*, 2016; Amaral *et al.*, 2017a). No presente trabalho, as lâminas (n= 3 para cada fragmento) foram escaneadas usando o equipamento *Scan Panoramic Histech scanner* (3D Histech Kft. Budapest, Hungary) conectado a um computador (*Fujitsu Technology Solutions GmbH, Munich, Germany*), conforme (Amaral *et al.*, 2017a).

As lâminas foram analisadas utilizando os softwares *Pannoramic Viewer 1.15.2 SP2 RTM* (3D Histech kft) ou *Histoquant* (3D Histech kft), que fornecem uma análise morfométrica detalhada com medições precisas de diferentes parâmetros histológicos em alta resolução das lâminas histológicas inteiras.

Foram considerados granulomas apenas àqueles que apresentavam pelo menos um ovo em seu interior. O total de lâminas, granulomas e células analisados estão descritos no quadro 1, onde foram avaliados os seguintes parâmetros qualitativos e quantitativos:

Animais (grupos)	Fragmentos /animal	Secções /Fragmento	Total Lâminas analisadas		Granulomas analisados		Células
	n	n	Área (mm ²)	n	Área (mm ²)	n	n
Controle	4	12	103.905,18	12	0	0	0
Fase Aguda	4	12	134.847,64	12	11.688,79	151	78.564
Fase crônica	4	12	194.322,77	12	10.039,49	291	79.279

Quadro 1: Amostras analisadas em cada grupo experimental.

5.2.6.1 NÚMERO DE GRANULOMAS POR ÁREA SECCIONAL

Para mostrar um panorama geral da ocorrência de granulomas no fígado durante a esquistossomose mansônica, com auxílio do software *Pannoramic Viewer* estes foram quantificados e, a área total da secção tecidual e a área de granulomas mensuradas. Assim, foi estabelecido o número de granulomas por área de tecido hepático.

5.2.6.2 CLASSIFICAÇÃO DOS GRANULOMAS EM ESTÁGIOS EVOLUTIVOS

Granulomas foram morfologicamente classificados de acordo com (Amaral *et al.*, 2017a) em quatro estágios evolutivos, compostos por 1 estágio pré- granulomatoso e 3 estágios granulomatosos. Estágios evolutivos relacionados à escala temporal:

(I) Pré-granulomatoso exsudativo (PE) - caracterizado pela presença de populações de células inflamatórias infiltrantes recém chegadas ao tecido em torno do ovo do parasito;

(II) Necrótico-exsudativa (NE) - caracterizado por um halo central de necrose e numerosas populações de células inflamatórias distribuídas irregularmente nas camadas subsequentes;

(III) Exsudativo-produtivo (EP) - caracterizado por uma estrutura rica em fibras colágenas e populações de células inflamatórias, apresentando um aspecto mais organizado e circunferencial;

(IV) Produtivo (P) - caracterizado por uma faixa espessa de fibras colágenas entre o ovo e as populações de células inflamatórias, mais concentradas na periferia do granuloma.

5.2.6.3 IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS EM GRUPOS CELULARES ESPECÍFICOS (POPULAÇÕES CELULARES)

Todas as células de todos os granulomas nos diversos estágios evolutivos (PE, NE, EP e P) foram identificadas no tecido hepático por WSI com auxílio dos softwares *Pannoramic Viewer* e *Histoquant*. Foram avaliados parâmetros da morfologia nuclear, características citoplasmáticas e diâmetro das células. Os diâmetros das células foram calculados com o auxílio do software *Image J*. A classificação das células em populações foi feita de acordo com os padrões morfológicos encontrados em comparação com os já estabelecidos para tipos celulares frequentes em granulomas esquistosomóticos (Bentley *et al.*, 1982; Lenzi *et al.*, 1998).

Células com características celulares de processos de morte (mortas ou morrendo) ou imaturas não foram consideradas. Células com morfologia atípica, em divisão, ou discrepantes foram classificadas na categoria "não identificadas".

5.2.7 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA COMPOSIÇÃO CELULAR AO LONGO DA EVOLUÇÃO DO GRANULOMA

Para avaliação da composição celular da comunidade do granuloma nos diferentes estágios evolutivos, todas as células classificadas em suas determinadas populações, foram precisamente quantificadas com auxílio do software *Histoquant*

(3D Histech kft). A abundância foi calculada pela frequência (%) de cada população celular para os quatro estágios evolutivos nos granulomas (PE, NE, EP e P). A densidade de cada população celular no granuloma foi estabelecida em função da área total de cada granuloma. As áreas dos granulomas foram medidas com auxílio do software *Pannoramic Viewer 1.15.2 SP2 RTM (3D Histech kft)*.

5.2.7.1 AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DESCRITIVOS DA COMUNIDADE CELULAR DOS GRANULOMAS

O granuloma é formado por uma verdadeira comunidade de populações celulares distintas que são integradas e podem ser consideradas um ecossistema (Conforme discutido no Capítulo 1). Tendo em vista a aplicação da ecologia no entendimento de populações e comunidades celulares, foram avaliados os seguintes aspectos descritivos relacionados com a estrutura da comunidade celular do granuloma.

- Densidade: a densidade foi calculada através do número de células por área em todos os estágios evolutivos do granuloma ao longo do tempo;
- Abundância: a abundância foi estabelecida através da frequência de cada população celular em cada estágio evolutivo do granuloma ao longo do tempo;
- Riqueza: a riqueza foi mensurada através do levantamento da composição da comunidade celular dos granulomas em todos os estágios evolutivos do granuloma ao longo do tempo;
- Similaridade: a similaridade foi avaliada considerando a abundância das populações celulares. Utilizamos análises de agrupamento para investigar quais comunidades celulares eram mais similares;
- Diversidade: a diversidade foi mensurada através dos índices de Margalef e Shannon.

5.2.7.2 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES NA ZONAÇÃO MORFOLÓGICA DO GRANULOMA

Os granulomas podem ser visivelmente divididos em zonas características em torno do ovo. Essas zonas são organizadas pela disposição da matriz extracelular colágena (Lenzi *et al.*, 2008). No presente trabalho, com o auxílio do software *Pannoramic Viewer (3D Histech kft)*, três zonas morfológicas em cada granuloma necrótico exudativo foram delimitadas: periovular (região mais próxima ao ovo), mesovular (região intermediária do granuloma) e periférica (região mais afastada do ovo). As células foram contadas e foi estabelecida a frequência das populações celulares em cada zona. Para esta análise foram avaliados granulomas nas fases aguda e crônica do estágio NE, os quais apresentam maior quantidade de células e também nítida distinção entre as zonas.

5.2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os parâmetros avaliados foram comparados entre fases aguda e crônica. Foram utilizados testes de médias em todas as comparações. Para comparação entre duas médias foi utilizado o teste T quando os dados atendiam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias. Caso os dados não atendessem aos pressupostos, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para comparações entre três médias ou mais, foi feito o teste de variâncias one way ANOVA quando os dados atendiam aos pressupostos de homogeneidade das variâncias e a normalidade dos resíduos. O teste ANOVA foi seguido pelo pós teste de Tukey para múltiplas comparações. Quando os dados não atendiam aos pressupostos, foi realizado o teste não paramétrico Kruskal Wallis, seguido pelo pós teste de comparações múltiplas de Wilcoxon.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* R, versão 3.5.1 e os gráficos foram gerados no *software* GraphPad Prism® 6.01(San Diego, CA,USA). O grau de significância empregado para todas as análises foi $p \leq 0,05$.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 OCORRÊNCIA DE GRANULOMAS ESQUISTOSSOMÓTICOS NO TECIDO HEPÁTICO

Camundongos foram infectados ou não com *S. mansoni* e cortes histológicos de fígado foram analisados por WSI nas duas fases da doença, aguda e crônica. Secções do fígado de animais não infectados apresentaram parênquimas hepáticos homogêneos, sem a presença de infiltrados inflamatórios ou granulomas (Figura 1 A). Animais infectados exibiram diversos processos inflamatórios e formações de granulomas no tecido hepático em torno dos ovos do parasito, nas duas fases da doença (Figura 1 B), o que confirma a infecção e estabelecimento da esquistossomose nestes animais.

Primeiro, para investigar a frequência dos granulomas nas fases aguda e crônica, foi contabilizado o número total de granulomas por área de secção tecidual. O número de granulomas por área seccional foi de $1,16 \pm 3,96$ e $8,11 \pm 2,33$ na fase aguda e crônica, respectivamente. Desta forma, animais na fase crônica da esquistossomose apresentaram sete vezes mais granulomas por mm^2 de tecidos hepáticos do que animais da fase aguda (Figura 1 C). A fase aguda e crônica da doença são períodos marcados por sintomatologia característica ao longo da evolução da doença

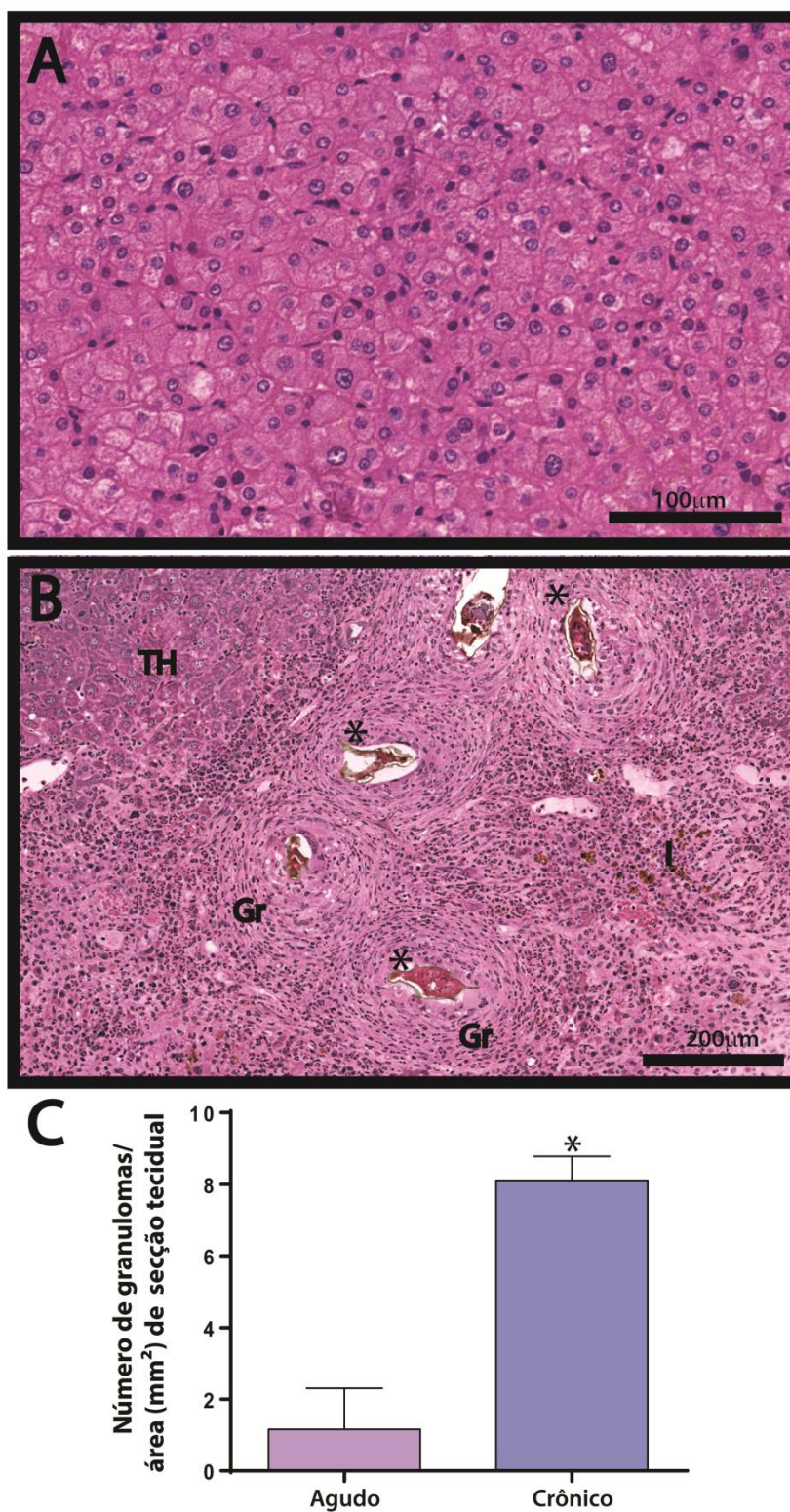


Figura 1: A infecção por *S. mansoni* desencadeia a imigração de células para o tecido hepático. (A) Tecido hepático íntegro sem lesões aparentes. (B) Tecido hepático (TH) infectado com áreas contendo hepatócitos e abundante infiltrado inflamatório (I). Presença de granulomas (Gr) em torno dos ovos (*) de *S. mansoni*.

(C) Número de granulomas por área de secção tecidual. O símbolo informa a diferença significativa entre as médias.

(Gryseels *et al.*, 2006; Gryseels, 2012). Desta forma o aumento do número de granulomas pode representar a evolução da doença.

Em seguida, os granulomas hepáticos nas duas fases da doença foram classificados em quatro estágios evolutivos, em sequência: PE, NE, EP e P (Amaral *et al.*, 2017a). Considerando apenas o processo de evolução do granuloma nas fases aguda e crônica, em conjunto, todos os estágios evolutivos foram encontrados. Análises quantitativas mostraram que os granulomas NE e EP são os mais frequentes (NE = $37,8 \pm 12,22\%$, EP = $40,7 \pm 13,75\%$, Figura 2 B).

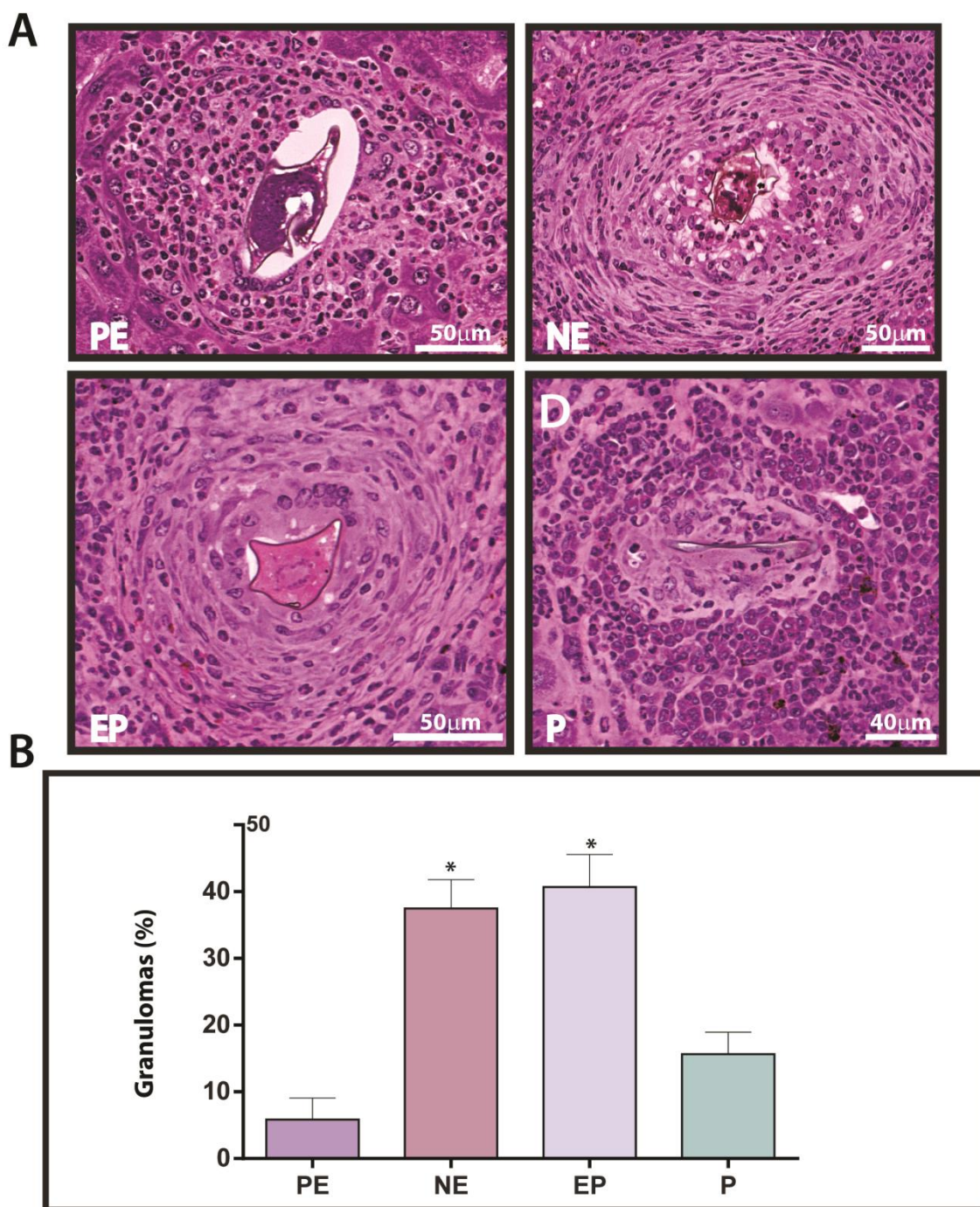
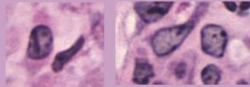
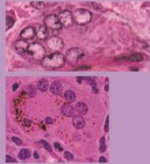
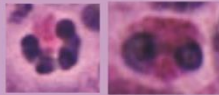

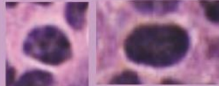
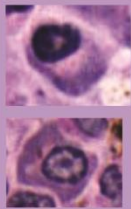
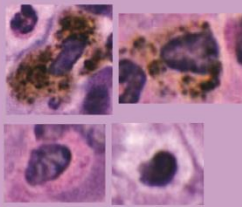
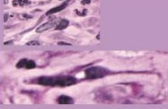
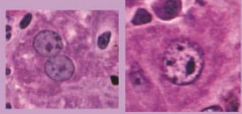
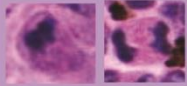


Figura 2: Classificação morfológica dos estágios evolutivos dos granulomas hepáticos desenvolvidos por *S. mansoni* ao longo da evolução da doença. (A) Cortes histológicos de granulomas hepáticos murinos: (PE) Granulomas pré-granulomatoso exudativo; (NE) Granuloma necrótico exudativo; (EP) Granuloma exudativo produtivo; (P) Granuloma produtivo. (B) Proporção dos estágios evolutivos dos granulomas ao longo da infecção. * $p > 0,05$.

5.3.2 POPULAÇÕES CELULARES DO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO HEPÁTICO

No presente trabalho, foram identificados diversos tipos celulares nos diferentes estágios evolutivos dos granulomas esquistossomóticos do fígado (Figura 3). A classificação das células em populações foi realizada de acordo com padrões morfológicos das células identificadas, conforme descrito no Material e Métodos (Seção 2.6.3). Foram identificadas, classificadas e quantificadas 157.843 células distribuídas em 10 populações celulares no granuloma: eosinófilos, macrófagos epitelióides, mononucleares, células gigantes, linfócitos, polimorfonucleares, plasmócitos, fibroblastos, hepatócitos e células não identificadas (Quadro 2; Figura 3).

Os conjuntos das populações de células aqui descritas caracterizam comunidade celular do granuloma (Quadro 2). Em sequência, avaliamos aspectos relacionados à estrutura desta comunidade através da aplicação de análises comumente usadas para descrição de comunidades em ecossistemas de maior escala. Foram avaliados aspectos da riqueza, similaridade, abundância, densidade e diversidade.

Populações Celulares			
Tipo Celular	Caracterização Morfológica	Diâmetro Médio	Histologia
Macrófagos Epitelióides	Possui volume aumentado; Núcleo alongado com cromatina frouxa (lembrando o núcleo de fibroblastos); Citoplasma abundante e róseo com limites imprecisos.	18,2 μm	
Células Gigantes	Células volumosas com 3 ou mais núcleos arranjados em ferradura na periferia da célula ou dispersos pelo citoplasma; Citoplasma abundante com ou sem a presença de pigmentos de hemozoína.	55,7 μm	
Eosinófilos	Núcleo bilobulado ou polilobulado; Citoplasma róseo fortemente corado por eosina.	9,1 μm	
Polimorfonucleares	Núcleo bilobulado ou polilobulado; Citoplasma bem delimitado.	7,7 μm	
Linfócitos	Núcleo redondo, denso e pequeno; Citoplasma muito escasso (quase não visível).	7,1 μm	
Plasmócitos	Possui formato ovalado com núcleo redondo e excêntrico; Cromatina nuclear com aspecto de "roda de carroça" visto em poucas células; Citoplasma nitidamente basófilo; Apresenta impressão negativa na região citoplasmática rica em retículo endoplasmático rugoso.	12,3 μm	
Mononucleares	Forma celular variável de arredondada a alongada; Núcleo redondo ou ovalado com cromatina frouxa; Citoplasma abundante podendo conter elementos fagocitados (principalmente hemozoína), ou apresentar-se abundante e róseo;	12,4 μm	
Fibroblastos	Núcleo ovalado ou alongado com cromatina frouxa; Citoplasma escasso podendo formar prolongamentos saindo dos pólos nucleares.	38,6 μm	
Hepatócitos	Núcleo heterocromático (mononucleada ou binucleada); Citoplasma abundante com diversas granulações referentes presença de abundantes organelas citoplasmáticas.	38,4 μm	
Não Identificáveis	Núcleo não identificável com aspectos de morte celular ou em divisão; Citoplasma abundante.	10,5 μm	

Quadro 2: Critérios morfológicos utilizados na classificação, identificação e quantificação de células nos granulomas esquistossomóticos hepáticos murinos.

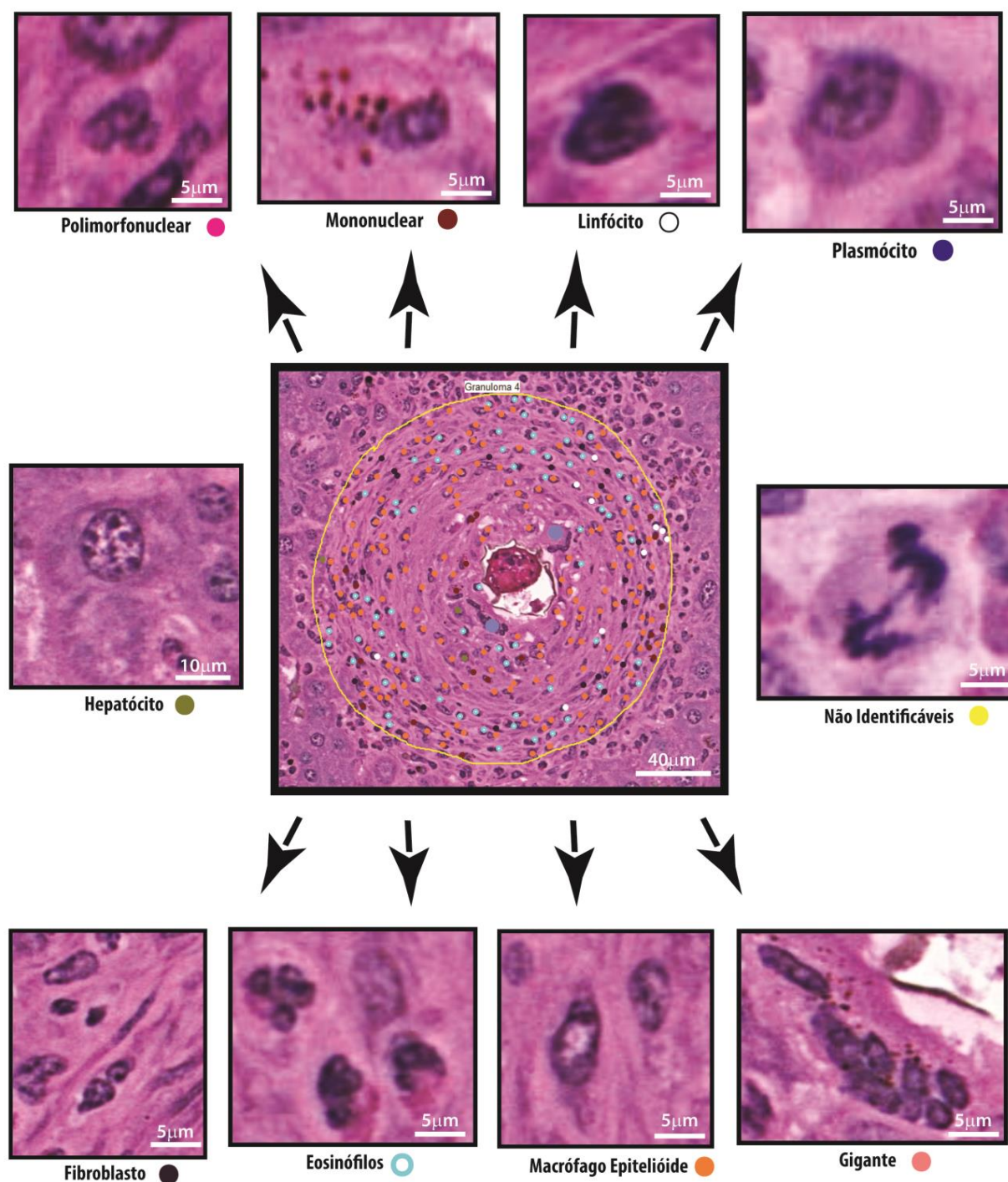


Figura 3: Identificação e quantificação das populações celulares nos granulomas esquistossomóticos hepáticos murinos. Observe granuloma central delimitado por uma linha amarela com diversas marcações (pontos coloridos). Em detalhes observe as diferentes populações celulares encontradas. Os pontos coloridos representam as marcações feitas através do software *Histoquant* nas diferentes populações celulares.

5.3.3 RIQUEZA E SIMILARIDADE DA COMUNIDADE CELULAR DO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO HEPÁTICO

A riqueza consiste no número de espécies que se têm em uma determinada área ou comunidade. Ela pode representar a medida de diversidade mais básica (Peet, 1974; Melo, 2008). A similaridade correlaciona as amostras das comunidades estudadas ordenando-as de acordo com seus níveis de semelhança, podendo considerar a abundância das espécies levantadas (Washington, 1984).

Considerando as populações celulares, a riqueza foi a mesma nos diferentes estágios evolutivos do granuloma, em que foram encontradas 10 populações celulares. Aqui, utilizamos o índice de similaridade de Bray- Curtis, que considera a abundância das populações para descobrir quais comunidades celulares dos granulomas eram mais similares. A análise de agrupamento revelou que as comunidades presentes nos granulomas NE e EP são as mais similares, enquanto a comunidade celular do granuloma PE é a menos similar as outras. O coeficiente de correlação cofenética foi 99,84%. Esse coeficiente aponta o grau de confiança na análise de dados apresentada no dendograma (Figura 4).

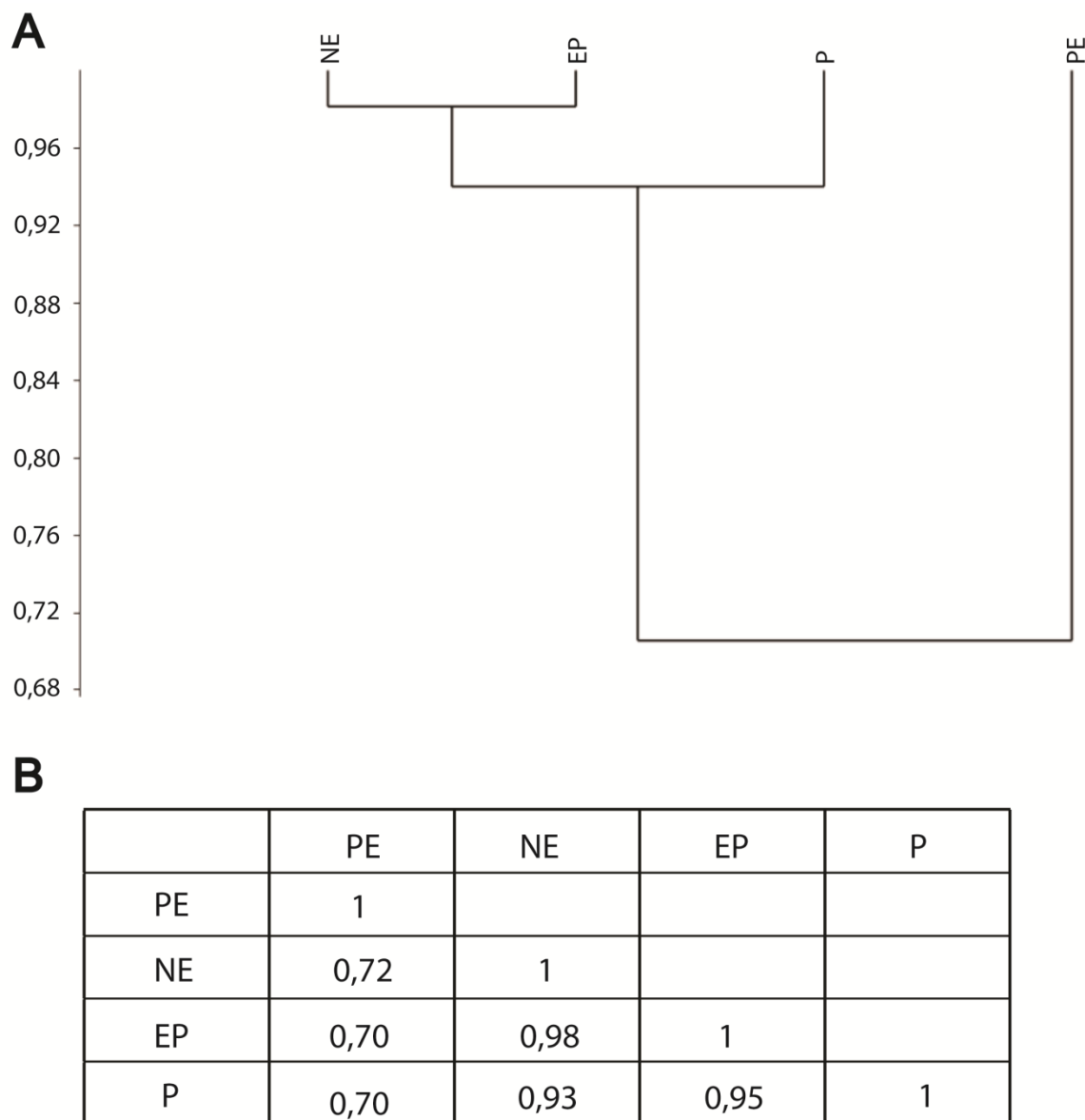


Figura 4: Similaridade entre as comunidades presentes nos granulomas. (A) Dendograma. (B) Matriz de Similaridade.

5.3.4 ABUNDÂNCIA E DENSIDADE DAS POPULAÇÕES DO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO HEPÁTICO

Para avaliar a abundância e a densidade das populações celulares nos granulomas ao longo dos estágios evolutivos, cada célula foi contada e a área do granuloma medida através dos softwares do *Pannoramic Viewer* e *Histoquant*. A abundância foi determinada pela proporção de uma população considerando toda a comunidade celular do granuloma e a densidade estabelecida em número de células por área de granuloma. Avaliações quantitativas por WSI mostraram abundância para as populações do granuloma conforme representadas na Figura 5 (A-D; Tabela 2). Pode-se notar que nos granulomas PE os eosinófilos são a população mais abundante (52,23 %, Figura 5 A), enquanto que no decorrer da evolução do granuloma (NE, EP e P) a principal população é composta por macrófagos epitelióides (cerca de 50%, Figura 5 B-D). Interessantemente, foi notado que a proporção da população das mononucleares aumenta ao longo da evolução do granuloma e a de fibroblastos aumenta no último estágio evolutivo do granuloma (P, Figura 5 D).

As populações celulares que foram mais abundantes, eosinófilos e macrófagos epitelióides, também foram as que apresentaram maior densidade. Vale ressaltar, que a densidade eosinófilos foi maior no granuloma PE ($6,13 \pm 1,68$ eosinófilos por área), diminuindo ao longo de estágios evolutivos (Figura 5 E). Em contrapartida, a população de macrófagos se manteve mais ou menos estável ao longo da evolução do granuloma (PE, NE, EP, P), aprestando um pico de aumento na fase EP (Figura 5 E).

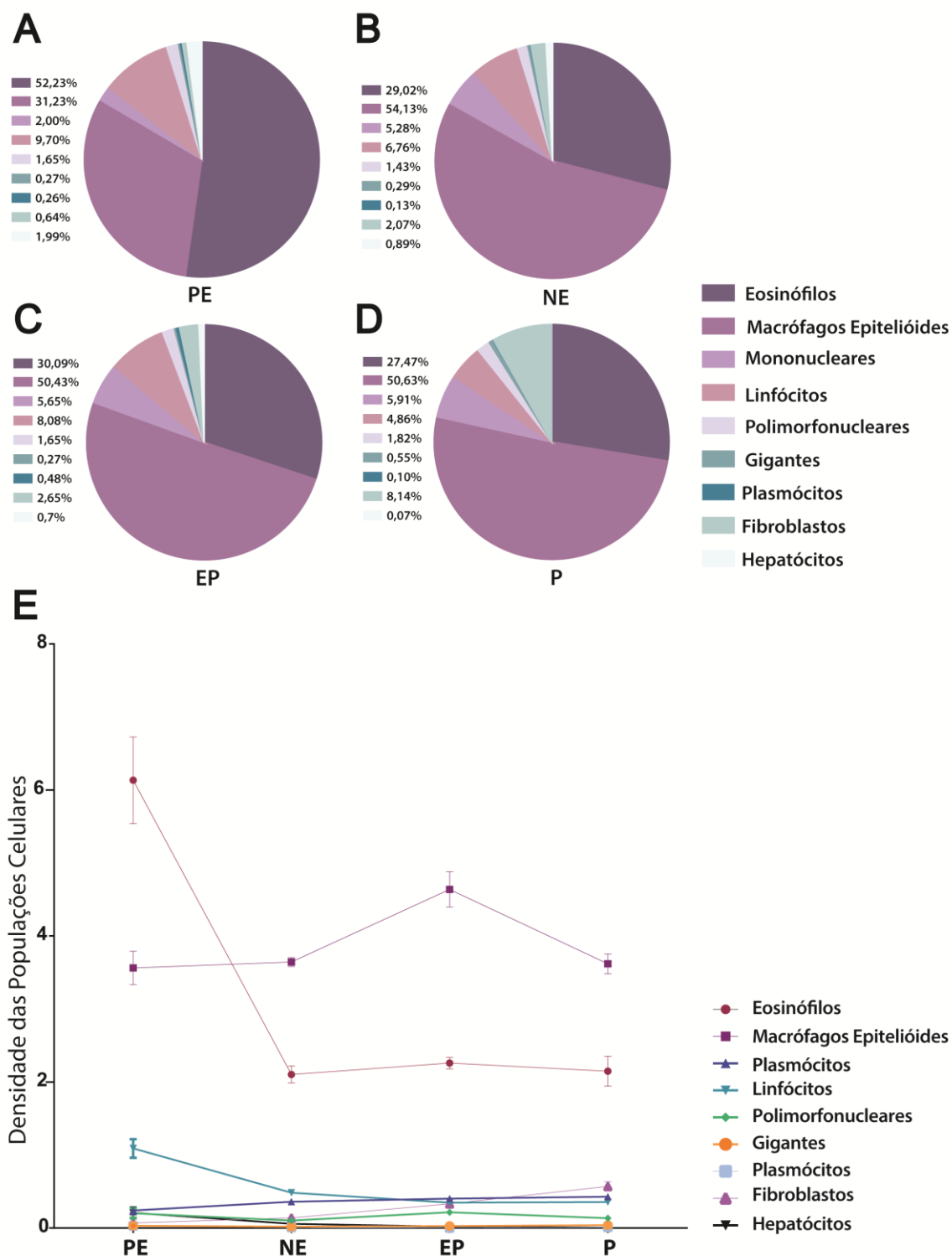


Figura 5: Abundância e densidade das populações celulares presentes nos granulomas. (A) Proporção das populações celulares encontradas em granulomas PE. (B) Proporção das populações celulares encontradas em granulomas NE. (C) Proporção das populações celulares encontradas em granulomas EP. (D) Proporção das populações celulares encontradas em granulomas P. (E) Densidade das populações celulares ao longo da doença.

Frequência das Populações Celulares Dentro dos Diferentes Granulomas				
	PE	NE	EP	P
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Eosinófilos	52,93 ± 9,99; a	26,80 ± 9,68; a	27,61 ± 10,05; a	27,47 ± 14,21; a
Macrófagos Epitelióides	33,07 ± 4,57; b	56,99 ± 8,88; b	55,99 ± 10,21; b	50,63 ± 13,72; b
Mononucleares	4,46 ± 4,51; c	4,96 ± 2,08; c, d	4,92 ± 3,08; c, d, i	5,91 ± 4,15; c, d, h, i
Linfócitos	6,68 ± 0,46; d	4,71 ± 2,64; d, i	4,23 ± 2,81; d, h, i	4,86 ± 3,45; d, h, i
Polimorfonucleares	1,91 ± 0,90; e	2,81 ± 1,71; e, h, i	2,54 ± 2,27; e	1,82 ± 1,99; e
Células Gigantes	0,16 ± 0,22; f	0,23 ± 0,35; f	0,34 ± 0,53; f	0,55 ± 0,70; f
Plasmócitos	0,16 ± 0,22; g	0,01 ± 0,05; g	0,02 ± 0,10; g	0,10 ± 0,36; g
Fibroblastos	0,32 ± 0,45; h	3,13 ± 3,14; h, i	4,09 ± 3,42; h, i	8,14 ± 6,26; h, i
Não leucócitos	0,32 ± 0,45; i	0,35 ± 0,65; i	0,25 ± 0,55; i	0,07 ± 0,24; i

Tabela 2: Resultados dos testes estatísticos para as frequências das populações celulares em cada estágio evolutivo do granuloma. As diferenças estatísticas são referentes as médias encontradas nos gráficos da figura 5-A,B,C,D e são apontadas pelas letras. Compare as células das mesmas colunas.

5.3.5 DIVERSIDADE DAS POPULAÇÕES CELULARES DO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO HEPÁTICO

Para avaliar se a diversidade de populações celulares é alterada ao longo da evolução do granuloma, foram aplicados índices de diversidade frequentemente utilizados para medir a diversidade de espécies na natureza, índice de Margalef e de Shannon (Magurran, 1988; Magurran, 2011). Considerando os dois índices aplicados a maior diversidade pode ser encontrada em PE (índice de Margalef = 1,23±0,19) ou EP (índice de Shannon = 1,70 ± 0,11) (Figura 6).

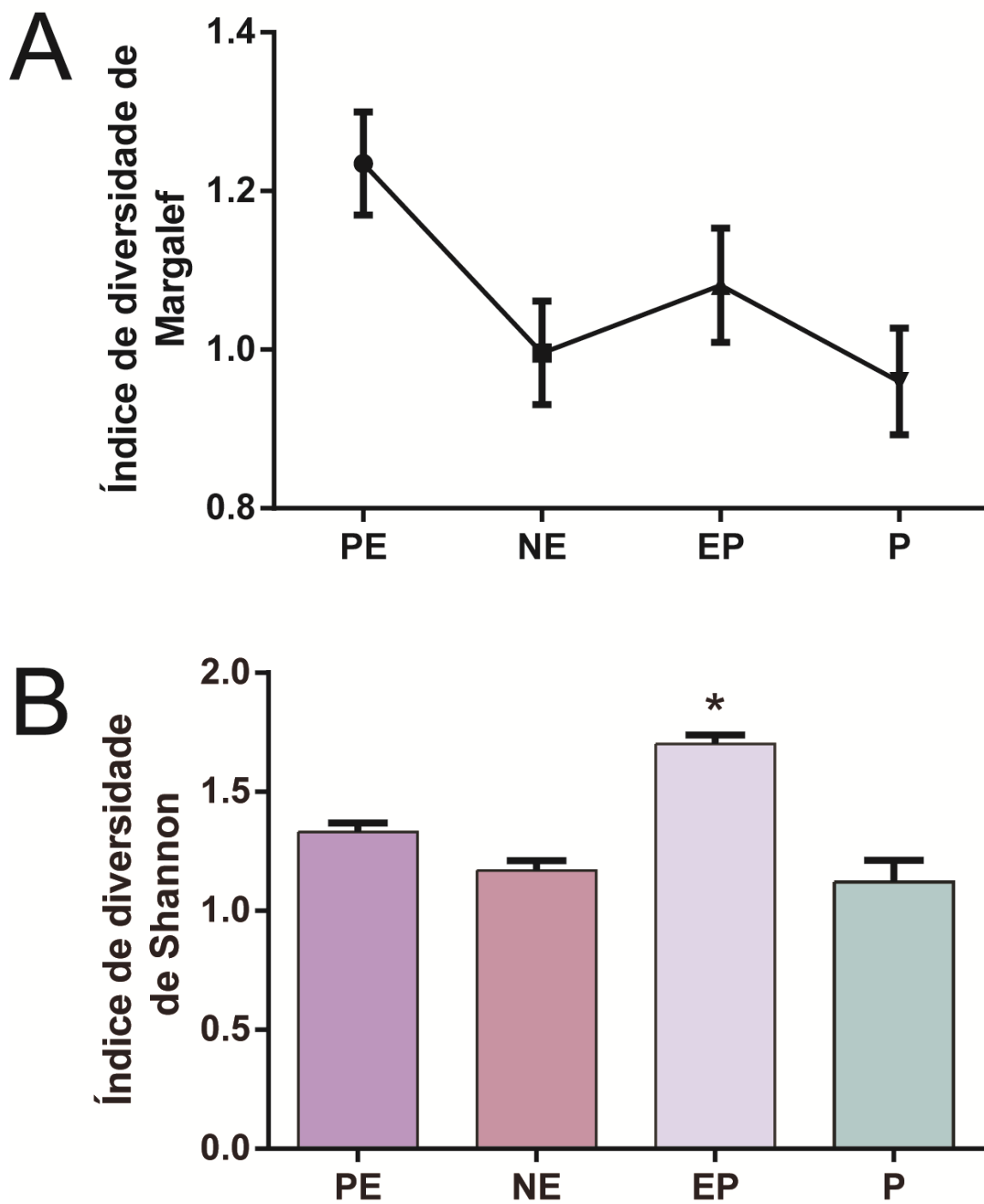


Figura 6: Diversidade das comunidades celulares dos granulomas ao longo do tempo. (A) Diversidade encontrada após a aplicação do índice de Margalef. (B) Diversidade encontrada após a aplicação do índice de Shannon.

5.3.6 DISTRIBUIÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES NO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO HEPÁTICO

Durante o processo de formação do granuloma, ocorrem interações intrincadas entre as diversas populações celulares e também com a matriz extracelular. A medida que o granuloma amadurece, é possível distinguir três zonas a partir da estrutura do arcabouço colagênico (Lenzi *et al.*, 2008). Principalmente nos granulomas encontrados nos estágios necróticos exudativos e exudativos produtivos.

No presente trabalho, nós delimitamos granulomas NE em três zonas bem definidas: Periovular, Mesovular e Periférica. Nós investigamos a distribuição das células aqui descritas e quantificadas nas três zonas (Figura 7). É notável que em todas as regiões, as principais populações celulares encontradas são macrófagos epitelióides e eosinófilos, por serem as populações dominantes nos granulomas (Figura 5). Linfócitos são principalmente encontrados na região periovular. As proporções das populações de mononucleares e polimorfonucleares não se alteram significativamente nas três zonas. A população de plasmócitos ocorre exclusivamente na zona periférica. As populações de células gigantes e hepatócitos ocorrem em todas as zonas, mas principalmente nas zonas periovular e periférica. A proporção da população de fibroblastos aumenta nas zonas mesovular e periférica. As populações de Fibroblastos organizam a estrutura do granuloma através da secreção de matriz, mas também pela morfologia fusiforme que possuem (Quadro 2)

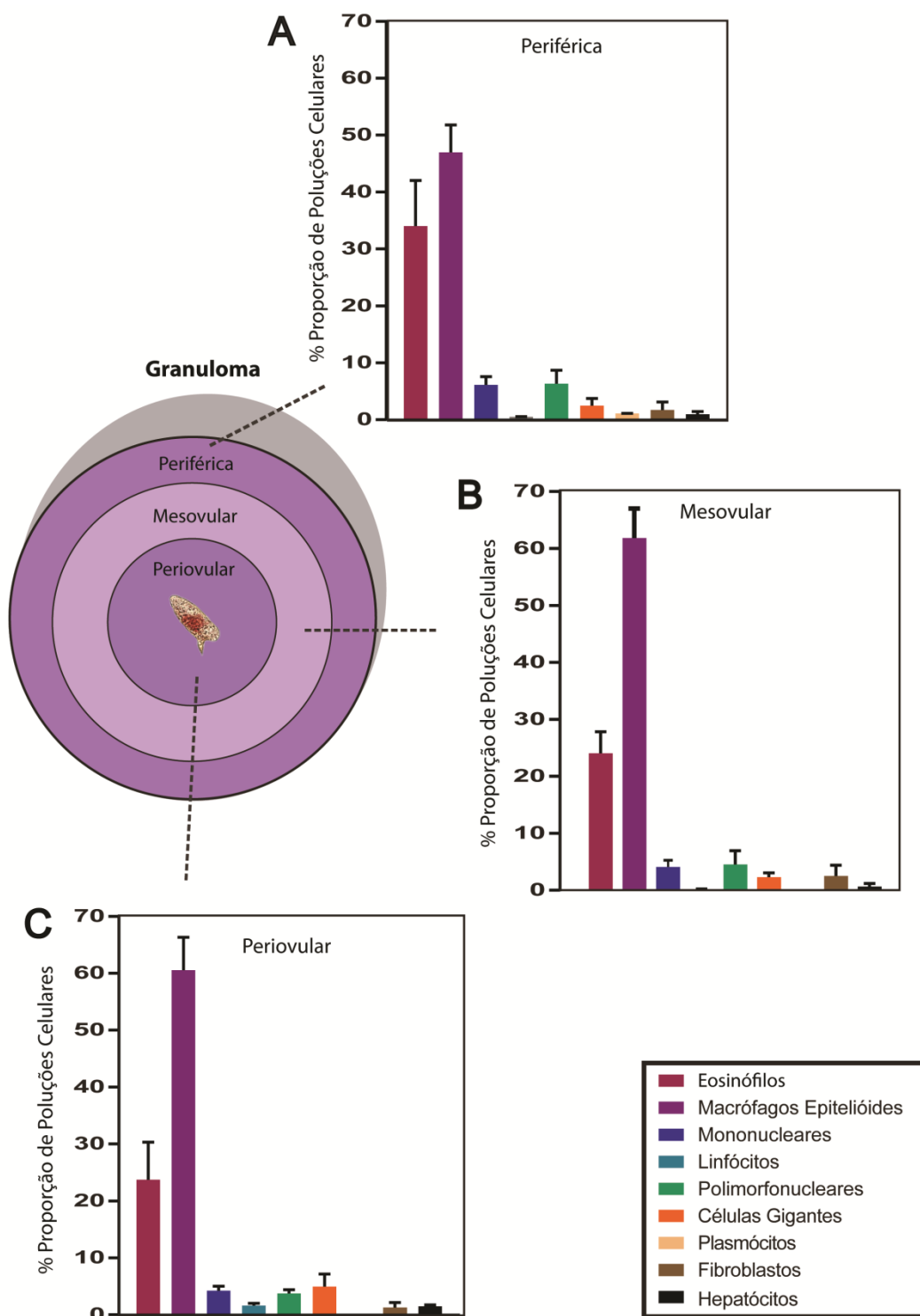


Figura 7: Distribuição das populações celulares nas três zonas definidas nos granulomas. (A) Proporções das populações celulares na zona periférica. (B) Proporções das populações celulares na zona mesovular. (C) Proporções das populações celulares na zona periovular.

6 DISCUSSÃO

A formação de granulomas em órgãos alvo é uma característica marcante da esquistossomose mansônica. O granuloma esquistossomótico é uma coleção compacta e organizada de células migrantes, que junto com células do órgão afetado, dispõem-se em meio a componentes de uma matriz extracelular heterogênea, formando uma estrutura esférica, que circunda cada ovo individualmente (Lenzi e Romanha, 2003; Lenzi, Romanha, *et al.*, 2006; Lenzi *et al.*, 2008).

Neste trabalho caracterizamos a comunidade celular presente nos granulomas durante seu processo de maturação e involução. Populações de eosinófilos inicialmente dominam a colonização dos granulomas, porém a medida que os granulomas evoluem no espaço-tempo, populações de macrófagos epitelióides passam a ser a população celular mais freqüente (Figura 5 A-D).

Vale ressaltar que a identificação, classificação e quantificação dos granulomas e das populações celulares realizadas no presente trabalho, só foi possível pela utilização da técnica WSI. Este é o processo pelo qual uma imagem digital de alta resolução é criada através do escaneamento da lâmina histológica inteira. Técnica de WSI vem sendo cada vez mais empregadas em diferentes estudos e para o diagnóstico preciso na identificação de células e tecidos e suas características histopatológicas associadas (Al-Janabi *et al.*, 2012; Cornish *et al.*, 2012; Fónyad *et al.*, 2012; Ghaznavi *et al.*, 2013; Kawano *et al.*, 2013). Em estudos anteriores, o WSI já se mostrou uma ferramenta confiável para avaliação dos estágios de distribuição, tamanho e evolução dos granulomas esquistossomóticos em grandes áreas de tecidos (Amaral, Kátia B *et al.*, 2016; Amaral *et al.*, 2017a; Dias, Amaral, Malta, Silva, Rodrigues, Rosa, Rodrigues, Chiarini-Garcia, *et al.*, 2018).

No presente trabalho, o escaneamento total das lâminas conjugadas com as análises pelos softwares *Pannoramic viewer* e *Histoquant* possibilitaram excelente visualização das características teciduais hepáticas e do granuloma, bem como das populações celulares e seus aspectos morfológicos (Figura 3). Desta forma, foi possível realizar a minuciosa identificação e classificação dos diferentes granulomas e populações celulares em todas as áreas de granulomas nos cortes histológicos (Quadro 2), além de uma análise quantitativa precisa sobre esses aspectos. Tal

procedimento é inviável em microscopia de luz convencional, considerando o esforço amostral realizado no presente trabalho. Ao microscópio de luz usualmente para análises de células do granuloma, são delimitados campos de contagem em aumentos fixos o que impossibilita o acesso do corte inteiro, limitando a eficiência na identificação de células e a precisão das contagens (Lenzi *et al.*, 1998).

Inicialmente, foi realizado um estudo geral da ocorrência de granulomas no fígado dos animais infectados com *S. mansoni* na fase aguda (55 dias) e crônica (115 dias) da esquistossomose. Nossos resultados mostraram o aumento do número de granulomas no fígado na fase crônica da doença. Este achado está relacionado ao fato de os vermes adultos, que habitam preferencialmente as veias da vasculatura mesentéricas do hospedeiro definitivo ovopositarem diariamente (Gryseels *et al.*, 2006; Gryseels, 2012). Alguns destes ovos vão chegar ao fígado e ficarão presos aos vasos capilares sinusóides, devido a seu diâmetro insuficiente, e estimularão a formação de granulomas ao longo do estabelecimento e evolução da doença (Pearce, 2005; Carvalho *et al.*, 2008; Gryseels, 2012). As fases aguda e crônica da esquistossomose, apesar de serem frequentemente utilizadas para estudo em camundongos, representam apenas a evolução da sintomatologia característica da doença ao longo do tempo em hospedeiros definitivos humanos (Gryseels *et al.*, 2006; Gryseels, 2012). Entretanto, cada granuloma representa um sistema dinâmico evolutivo partindo de um estágio pré-granulomatoso, caracterizado pelo influxo e rearranjo de células ao entorno do ovo, a um estágio granulomatoso com distintos subtipos. Nesse processo, o granuloma parte de um estágio imaturo a maduro e de maduro a involucional (Hsü *et al.*, 1972; Lenzi *et al.*, 1998; Raso, Raso, Melo, *et al.*, 2012).

Portanto, consideramos no presente trabalho o processo de evolução do granuloma em conjunto ao longo da esquistossomose experimental, nas fases aguda e crônica. Os granulomas, independente da fase da doença, foram morfológicamente classificados em quatro estágios evolutivos: (PE) pré granulomatoso exudativo; (NE) necrótico exudativo, (EP) exudativo produtivo e (P) produtivo (Amaral *et al.*, 2017a). Nestes estágios as células do granuloma foram identificadas em populações que representam diferentes tipos celulares, de acordo com padrão morfológico. Considerando que populações ecológicas são conjuntos de indivíduos que apresentam características e funções semelhantes (Odum, 1966;

Odum e Barret, 2007), consideramos as categorias/tipos celulares aqui encontradas como as populações de células no granuloma esquistossomótico hepático murino (Figura 3). Foram identificadas as populações de eosinófilos, macrófagos epitelióides, mononucleares, células gigantes, linfócitos, polimorfonucleares, plasmócitos, fibroblastos e hepatócitos (Quadro 1).

Conforme discutido no capítulo 1, os granulomas esquistossomóticos hepáticos podem funcionar como verdadeiros ecossistemas celulares em evolução. A existência de variadas populações celulares coexistindo num mesmo espaço-tempo e com comportamentos e demanda de recursos similares podem constituir uma especializada comunidade celular comparável a ecossistemas em maior escala na natureza (Mcnaughton, 1973). Desta forma, para avaliar a composição da comunidade do granuloma, aplicamos ferramentas de análises ecológicas comumente usadas para avaliação clássica na descrição da estrutura da comunidade celular. A estrutura da comunidade é essencialmente a composição de uma comunidade, incluindo o número de espécies nela encontrada e seus números relativos (Odum e Barret, 2007). Foram avaliadas riqueza, similaridade, abundância e densidade, da comunidade celular do granuloma esquistossomótico do fígado. Aqui encontramos que a riqueza de populações celulares nos granulomas é a mesma (9 populações celulares) independente do estágio em que ele se encontre, durante todo o seu processo de evolução. Porém análises de similaridade indentificaram que a comunidade celular de granulomas no estágio inicial (PE) são menos similares aos estágios mais avançados. Além disso, observamos que a comunidade celular de granulomas em estágios intermediários são bastante similares (98%) entre si (NE e EP; Figura 4). Coeficientes de similaridade (Whittaker *et al.*, 2001; Carvalho e Felfili, 2011), mensuram a diversidade avaliando as comunidade de forma qualitativa (Whittaker, 1960) ao longo de gradientes ambientais ou do tempo (Magurran, 2011).

Estes achados referente a riqueza e similaridade, podem sugerir alterações na densidade e abundância de tipos celulares ao longo da evolução do granuloma relacionada com imunomodulação ao longo do tempo. De fato, nossas análises revelaram que houve diferenças na densidade e abundância das populações na comunidade celular ao longo do processo evolutivo do granuloma. Os granulomas, em geral, não são tipicamente compostos de tipos de células em igual abundância e

a ocorrência de células pode alterar de acordo com o tempo entre os estágios evolucionais do granuloma hepático em murinos (Lenzi *et al.*, 1998; Lenzi *et al.*, 2004; Alenzi, 2008). Em todos os estágios as populações celulares mais abundantes e com maior densidade foram as de eosinófilos e macrófagos epitelióides, enquanto plasmócitos e gigantes foram as de menor abundância e densidade. Desta forma, confirmamos que verdadeiramente as células do granuloma podem se comportar de forma semelhante às espécies de uma comunidade, onde há poucas espécies “comuns” abundantes e muitas espécies “raras” menos abundantes, descrevendo uma curva de distribuição de abundância lognormal (Krebs, 1989; Odum e Barret, 2007).

Destacamos que a dinâmica de algumas populações celulares ao longo do desenvolvimento do granuloma nos chamou a atenção. A abundância e densidade da população de eosinófilos decrescem progressivamente ao longo do desenvolvimento do granuloma. Estudos anteriores mostraram que 60-70% das células dos granulomas hepáticos são eosinófilos (Moore *et al.*, 1977; Amaral *et al.*, 2017a), e que o número destas células decaem progressivamente durante o desenvolvimento do processo granulomatoso (Lenzi, Sobral, *et al.*, 1987). Interessantemente, foi notado que a abundância da população de fibroblastos aumenta ao longo da evolução, principalmente no último estágio do granuloma (Figura 5 D). A população de fibroblastos é responsável pela síntese e deposição de colágeno no granuloma, o que determina o início de sua involução (Wyler *et al.*, 1981; Lukacs *et al.*, 1994). Assim, as variações na quantidade de células que compõe as populações ao longo do tempo podem estar associadas também com o aspecto funcional das células que vão determinar a evolução do granuloma.

Considerando que análises de similaridade e densidade/abundância mostraram variações entre ao longo da evolução do granuloma, resolvemos avaliar a diversidade de populações celulares na composição da comunidade do granuloma. O conceito de diversidade de espécies possui dois componentes, riqueza e abundância. A riqueza é baseada no número total de espécies presentes e a abundância é baseada na freqüência das mesmas (Odum e Barret, 2007).

Aqui, os índices de diversidade de Margalef e Shannon mostraram que a maior diversidade pode ser encontrada em PE (índice de Margalef = $1,23 \pm 0,19$) ou EP (índice de Shannon = $1,70 \pm 0,11$) (Figura 6). Vale ressaltar que o índice de

diversidade de Shannon leva em consideração a presença de espécies raras na comunidade, no presente trabalho representada por populações de plasmócitos e gigantes. Na natureza índices de diversidade que levam espécie rara em consideração são frequentemente utilizados para avaliar o quão importante é sua conservação, já que estas espécies têm papel fundamental nestes ecossistemas. O aspecto funcional de cada população celular no granuloma é fragmentado e ainda pouco sedimentado na literatura. A maior parte dos estudos aborda aspectos da biologia celular e imunologia, principalmente das células que se apresentam em maior proporção no granuloma. Portanto, extrapolando esse achado sobre a diversidade para este trabalho, podemos propor que as populações de plasmócitos e gigantes podem ter uma função crítica no granuloma e no seu desenvolvimento.

A fim de investigar como as populações celulares se distribuía no interior dos granulomas, delimitamos três zonas: periovular, mesovular e periférica em granulomas necróticos exudativos. Segundo (Lenzi *et al.*, 2004; Lenzi *et al.*, 2008), a distribuição das populações celulares no interior dos granulomas podem ser explicadas pela hipótese de adesão diferencial de (Steinberg, 1996). Essa hipótese postula que cada tipo de célula tem uma energia de adesão característica que, numa população mista, resulta em camadas celulares arranjadas concentricamente, devido a diferenças entre forças de adesão celular. É notável que em todas as regiões, as principais populações celulares encontradas são macrófagos epitelióides e eosinófilos, por serem as populações dominantes nos granulomas (Figura 6). Linfócitos são principalmente encontrados na região periovular. A população de plasmócitos ocorre exclusivamente na zona periférica. A proporção da população de fibroblastos aumenta nas zonas mesovular e periférica. As populações de fibroblastos organizam a estrutura do granuloma através da secreção de matriz, mas também pela morfologia fusiforme que possuem.

A maior parte dos estudos focados nas células dos granulomas esquistosomóticos murinos, aborda seu papel isoladamente, em um aspecto reducionista, sem considerar seu papel em um contexto mais amplo. Faz-se necessária uma abordagem integrativa do papel funcional das células durante a dinâmica de formação do granuloma. Conhecer quais interações ocorrem entre as populações celulares pode nos dar informações chave do funcionamento ecossistêmico do granuloma e apontar estratégias eficientes de tratamentos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

No presente trabalho buscamos estudar os granulomas esquistosomóticos murinos hepáticos, sob o ponto de vista da ecologia celular. Utilizamos diversos conceitos ecológicos clássicos para entender a dinâmica de formação dos granulomas. Nessa perspectiva, propusemos que granulomas funcionam como verdadeiros sistemas ecológicos e que o conjunto das populações celulares neles encontradas constituem uma verdadeira comunidade celular.

Ao aplicar estratégias clássicas de investigações de diversidade no granuloma detectamos que durante o processo de evolução, a riqueza (número de populações) se mantêm, mas as freqüências de abundância flutuam. Nesse contexto, se faz importante a investigação dos fatores que regulam as abundâncias das populações celulares durante a construção dos granulomas. Descrever as interações que neles existem em um contexto amplo pode ser a chave para entender a complexidade dessa resposta e apontar novos alvos terapêuticos.

8 REFERÊNCIAS

ADAMS, D. O. The granulomatous inflammatory response. A review. **The American Journal of Pathology**, v. 84, n. 1, p. 164, 1976.

AHMAD, A.; AHMAD, R. Understanding the mechanism of hepatic fibrosis and potential therapeutic approaches. **Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 18, n. 3, p. 155, 2012.

AKPOM, C. A.; WARREN, K. S. The inhibition of granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs. **The American Journal of Pathology**, v. 79, n. 3, p. 435, 1975.

AL-JANABI, S.; HUISMAN, A.; VAN DIEST, P. J. Digital pathology: current status and future perspectives. **Histopathology**, v. 61, n. 1, p. 1-9, 2012. ISSN 0309-0167.

ALENZI, F. Q. Apoptosis and eosinophils. Regulation and clinical relevance. **Saudi Medical Journal**, v. 29, n. 5, p. 643-656, 2008. ISSN 1658-3175.

ALLEY, T. R. Competition theory, evolution, and the concept of an ecological niche. **Acta Biotheoretica**, v. 31, n. 3, p. 165-179, 1982. ISSN 0001-5342.

AMARAL, K. B. et al. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0184696, 2017b. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28902908> >.

AMARAL, K. B. et al. Natural *Schistosoma mansoni* Infection in the Wild Reservoir *Nectomys squamipes* Leads to Excessive Lipid Droplet Accumulation in Hepatocytes in the Absence of Liver Functional Impairment. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0166979, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27880808> >.

AMEND, S. R. et al. Ecological paradigms to understand the dynamics of metastasis. **Cancer Letters**, v. 380, n. 1, p. 237-242, 2016. ISSN 0304-3835.

ANDERSON, L. A.; CHEEVER, A. W. Comparison of geographical strains of *Schistosoma mansoni* in the mouse. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 46, n. 2, p. 233-42, 1972b. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4537484> >.

ANTHONY, B. J.; RAMM, G. A.; MCMANUS, D. P. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 572-579, 2012. ISSN 1471-4922.

ANYAN, W. K. et al. Basophil depletion downregulates *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation. **Parasitology International**, v. 62, n. 6, p. 508-513, 2013. ISSN 1383-5769.

ARIZTIA, E. V. et al. The tumor microenvironment: key to early detection. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 43, n. 5-6, p. 393-425, 2006. ISSN 1040-8363 (Print) 1040-8363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050079> >.

BARRON, L.; WYNN, T. A. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 9, p. 2509-2514, 2011. ISSN 0014-2980.

BAZZAZ, F. A.; PICKETT, S. T. A. Physiological ecology of tropical succession: a comparative review. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 11, n. 1, p. 287-310, 1980. ISSN 0066-4162.

BENTLEY, A. G.; DOUGHTY, B. L.; PHILLIPS, S. M. Ultrastructural analysis of the cellular response to *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 6, p. 1168-1180, 1982. ISSN 0002-9637.

BOROJEVIC, R. Experimental murine schistosomiasis mansoni: establishment of the chronic phase of the disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87 Suppl 4, p. 171-4, 1992. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1343890> >.

BOROS, D. L.; WARREN, K. S. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, n. 3, p. 488-507, 1970. ISSN 0022-1007.

BRITO, J. M.; BOROJEVIC, R. Liver granulomas in schistosomiasis: mast cell-dependent induction of SCF expression in hepatic stellate cells is mediated by TNF- α . **Journal of Leukocyte Biology**, v. 62, n. 3, p. 389-396, 1997. ISSN 1938-3673.

BRULISAUER, A. R.; BRADFIELD, G. E.; MAZE, J. Quantifying organizational change after fire in lodgepole pine forest understorey. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, n. 11, p. 1773-1782, 1996. ISSN 0008-4026.

BRUNET, L. R. et al. Interleukin 5 (IL-5) is not required for expression of a Th2 response or host resistance mechanisms during murine schistosomiasis mansoni but does play a role in development of IL-4-producing non-T, non-B cells. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 3014-3018, 1999. ISSN 0019-9567.

BUONOCORE, E. et al. Modeling matter and energy flows in marine ecosystems using emergy and eco-exergy methods to account for natural capital value. **Ecological Modelling**, v. 392, n. 1, p. 137-146, 2019. ISSN 0304-3800.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 163-176, 2009. ISSN 1365-3024.

CADMAN, E. T.; LAWRENCE, R. A. Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? **Parasite Immunology**, v. 32, n. 1, p. 1-19, Jan 2010. ISSN 1365-3024 (Electronic) 0141-9838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042003> >.

CARVALHO, F. A.; FELFILI, J. M. Aplicação da diversidade alfa e beta para definição de áreas prioritárias para conservação: uma análise das florestas decíduais sobre afloramentos calcários no Vale do Paranã, Goiás. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 5, 2011. ISSN 1981-3163.

CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* & **Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Scielo-Editora FIOCRUZ, 2008. ISBN 8575413708.

CHASE, J. M.; LEIBOLD, M. A. **Ecological niches: linking classical and contemporary approaches**. University of Chicago Press, 2003. ISBN 0226101800.

CHEEVER, A. W. et al. Role of cytokines in the formation and downregulation of hepatic circumoval granulomas and hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93 Suppl 1, p. 25-32, 1998. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9921320> >.

CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 141-50, Mar 2014a. ISSN 1471-5007 (Electronic) 1471-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24433721> >.

CLEMENTS, F. E. **Plant succession: an analysis of the development of vegetation**. Carnegie Institution of Washington, 1916.

CO, D. O. et al. T cell contributions to the different phases of granuloma formation. **Immunology Letters**, v. 92, n. 1-2, p. 135-142, 2004. ISSN 0165-2478.

COELHO, P. M. Z. et al. *Schistosoma mansoni*: permanence of modulation of the granulomatous inflammatory response in mice cured in the chronic phase. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 12, p. 1393-1395, 1996. ISSN 0020-7519.

CORNISH, T. C.; SWAPP, R. E.; KAPLAN, K. J. Whole-slide imaging: routine pathologic diagnosis. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 19, n. 3, p. 152-159, 2012. ISSN 1072-4109.

DE SOUSA, M. A. B. Ecology of thymus dependency. **Contemporary Topics in Immunobiology**, v. 1, n. 1, p. 119-136, 1973.

DIAS, F. F. et al. Identification of piecemeal degranulation and vesicular transport of MBP-1 in liver-infiltrating mouse eosinophils during acute experimental *Schistosoma*

mansoni infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1, p. 3019, 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30619361> >.

EHLERS, S.; SCHAIBLE, U. E. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 411, 2012. ISSN 1664-3224 (Electronic) 1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23308075> >.

EL-MENEZA, S. et al. Dynamics of hepatic connective tissue matrix constituents during murine *Schistosoma mansoni* infection. **Hepatology**, v. 9, n. 1, p. 50-6, Jan 1989. ISSN 0270-9139 (Print) 0270-9139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2535698> >.

FIGLIUOLO DA PAZ, V. R.; FIGUEIREDO-VANZAN, D.; DOS SANTOS PYRRHO, A. Interaction and involvement of cellular adhesion molecules in the pathogenesis of *Schistosomiasis mansoni*. **Immunology Letters**, v. 206, p. 11-18, Feb 2019. ISSN 1879-0542 (Electronic) 0165-2478 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30503821> >.

FÓNYAD, L. et al. Validation of diagnostic accuracy using digital slides in routine histopathology. **Diagnostic Pathology**, v. 7, n. 1, p. 35, 2012. ISSN 1746-1596.

GATENBY, R.; BROWN, J. The evolution and ecology of resistance in cancer therapy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 3, p. a033415, 2018. ISSN 2157-1422.

GATENBY, R. A. Population ecology issues in tumor growth. **Cancer Research**, v. 51, n. 10, p. 2542-2547, 1991. ISSN 0008-5472.

GHAZNAVI, F. et al. Digital imaging in pathology: whole-slide imaging and beyond. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 8, n. 1, p. 331-359, 2013. ISSN 1553-4006.

GRAY, V.; LOWERY, D. A niche theory of interest representation. **The Journal of Politics**, v. 58, n. 1, p. 91-111, 1996. ISSN 0022-3816.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of South America**, v. 26, n. 1, p. 383-397, 2012.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006. ISSN 0140-6736.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The schistosoma granuloma: friend or foe? **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 89, 2013a. ISSN 1664-3224 (Electronic) 1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23596444> >.

HORN, H. S. The ecology of secondary succession. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 5, n. 1, p. 25-37, 1974. ISSN 0066-4162.

HSÜ, C. K. et al. Immunopathology of schistosomiasis in athymic mice. **Nature**, v. 262, n. 5567, p. 397, 1976. ISSN 1476-4687.

HSU, S. Y. et al. Comparative studies on the lesions caused by eggs of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in livers of albino mice and rhesus monkeys. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 66, n. 1, p. 89-97, Mar 1972. ISSN 0003-4983 (Print) 0003-4983 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4623247> >.

HUANG, L.; APPLETON, J. A. Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 10, p. 798-807, Oct 2016. ISSN 1471-5007 (Electronic)1471-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27262918> >.

JACOBS, W. et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocytefunction-associated antigen-1 in experimental *Schistosoma mansoni* infection and in synchronous periparticular hepatic granulomas in mice: immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy, and immunoelectron microscopy. **Parasitology Research**, v. 83, n. 5, p. 405-412, 1997. ISSN 0932-0113.

JACOBS, W.; DEELDER, A.; VAN MARCK, E. Schistosomal granuloma modulation. II. Specific immunogenic carbohydrates can modulate schistosome-egg-antigen-induced hepatic granuloma formation. **Parasitology Research**, v. 85, n. 1, p. 14-18, 1999. ISSN 0932-0113.

JANKOVIC, D. et al. CD4+ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 4, p. 619-29, Feb 16 1998. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9463412> >.

JORDÁN, F.; SCHEURING, I. Network ecology: topological constraints on ecosystem dynamics. **Physics of Life Reviews**, v. 1, n. 3, p. 139-172, 2004. ISSN 1571-0645.

KAPLAN, R. N.; RAFII, S.; LYDEN, D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. **Cancer Research**, v. 66, n. 23, p. 11089-11093, 2006. ISSN 0008-5472.

KAREVA, I. What can ecology teach us about cancer? **Translational Oncology**, v. 4, n. 5, p. 266-270, 2011. ISSN 1936-5233.

KAREVA, I. Cancer ecology: Niche construction, keystone species, ecological succession, and ergodic theory. **Biological Theory**, v. 10, n. 4, p. 283-288, 2015. ISSN 1555-5542.

KAWANO, Y. et al. Darkfield adapter for whole slide imaging: Adapting a darkfield internal reflection illumination system to extend wsi applications. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e58344, 2013. ISSN 1932-6203.

KAY, J. J. A nonequilibrium thermodynamic framework for discussing ecosystem integrity. **Environmental Management**, v. 15, n. 4, p. 483-495, 1991. ISSN 0364-152X.

KOROLEV, K. S.; XAVIER, J. B.; GORE, J. Turning ecology and evolution against cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 5, p. 371, 2014. ISSN 1474-1768.

KREBS, C. J. **Ecological Methodology**. Harper & Row New York, p.654. 1989

KROES, H. W. The niche structure of ecosystems. **Journal of Theoretical Biology**, v. 65, n. 2, p. 317-326, 1977. ISSN 0022-5193.

KUBOTA, H.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 3, p. 722-31, Sep 2004. ISSN 0006-3363 (Print)0006-3363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15115718 >.

LACINA, L. et al. Ecology of melanoma cell. **Histology and Histopathology**, p. 247-254, 2018.

LEMON, P. C. Successional responses of herbs in the longleaf-slash pine forest after fire. **Ecology**, v. 30, n. 2, p. 135-145, 1949. ISSN 1939-9170.

LENZI, H. L. et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 141-151, 1998. ISSN 0074-0276.

LENZI, H. L. et al. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 5, p. 639-643, 1999a. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10412576> >

LENZI, H. L. et al. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 77-90, 1991. ISSN 0074-0276.

LENZI, H. L. et al. Extramedullary hematopoiesis in murine schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 169-177, 1995. ISSN 0074-0276.

LENZI, H. L.; LENZI, J. A.; SOBRAL, A. C. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, n. 3-4, p. 433-5, 1987. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3132213> >.

LENZI, H. L. et al. Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: fractal arrangement, internal regulation, autopoietic component and closure.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101 Suppl 1, p. 219-31, Sep 2006. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308773> >.

LENZI, H. L.; ROMANHA, W. S. **Schistosomal granuloma is like a small multicellular organism that operates as a complex system.** 2003.

LENZI, H. L.; ROMANHA, W. S.; PELAJO-MACHADO, M. Possíveis níveis de complexidade na modelagem de sistemas biológicos Pode a matemática coreografar a dança biológica? In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE MATEMÁTICA APLICADA E COMPUTACIONAL, S. C., SP (Ed.). **Notas em Matemática Aplicada: Modelagem em Biomatemática**, 2004. p. 54-78

LENZI, H. L. et al. **Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico.** 2008. 569-654.

LENZI, H. L. et al. Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: fractal arrangement, internal regulation, autopoietic component and closure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 219-231, 2006. ISSN 0074-0276.

LENZI, H. L.; SOBRAL, A. C. L.; LENZI, J. A. In vivo kinetics of eosinophils and mast cells in experimental murine schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 1, p. 67-76, 1987. ISSN 0074-0276.

LEVIN, S. A. Ecosystems and the biosphere as complex adaptive systems. **Ecosystems**, v. 1, n. 5, p. 431-436, 1998. ISSN 1432-9840.

LIN, H. The stem-cell niche theory: lessons from flies. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 12, p. 931, 2002. ISSN 1471-0064.

LINS, R. A. et al. Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 173-8, Mar-Apr 2008. ISSN 0037-8682 (Print) 0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18545839> >.

LINS, R. A. B. et al. A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 173-178, 2008.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 4, p. 395-406, 2012. ISSN 0021-9525.

LUKACS, N. W. et al. The role of chemokines in *Schistosoma mansoni* granuloma formation. **Parasitology Today**, v. 1, n. 1, p. 322-324, 1994.

LUNDY, S. K.; LERMAN, S. P.; BOROS, D. L. Soluble egg antigen-stimulated T helper lymphocyte apoptosis and evidence for cell death mediated by FasL+ T and B cells during murine *Schistosoma mansoni* infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 271-280, 2001. ISSN 0019-9567.

MACLEAN, A. L.; FILIPPI, S.; STUMPF, M. P. The ecology in the hematopoietic stem cell niche determines the clinical outcome in chronic myeloid leukemia. **Proceedings National Academy of Science of the United States of America**, v. 111, n. 10, p. 3883-8, Mar 11 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24567385> >.

MAGURRAN, A. E. Why diversity? In: (Ed.). **Ecological diversity and its measurement**: Springer, 1988. p.1-5.

MAGURRAN, A. E. **Medindo a diversidade biológica**. 2011.

MARTIN, C. J.; CAREY, A. F.; FORTUNE, S. M. A bug's life in the granuloma. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 213-20, Mar 2016. ISSN 1863-2300 (Electronic) 1863-2297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26577238> >.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 13, Aug 9 2018a. ISSN 2056-676X (Electronic) 2056-676X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30093684> >.

MCNAUGHTON, S. J. **General Ecology**. 1973. ISBN 0030862183.

MEEUSEN, E. N.; BALIC, A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? **Parasitology Today**, v. 16, n. 3, p. 95-101, Mar 2000. ISSN 0169-4758 (Print) 0169-4758 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10689327> >.

MELO, A. S. O que ganhamos' confundindo'riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? **Biota Neotropica**. Vol. 8, n. 3, p. 21-27. 2008. ISSN 1678-6424.

MERLO, L. M. F. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 12, p. 924, 2006. ISSN 1474-1768.

MILLER, P. W.; MOTE, T. L.; RAMSEYER, C. A. An empirical study of the relationship between seasonal precipitation and thermodynamic environment in Puerto Rico. **Weather and Forecasting**, 2019.

MOORE, D. L.; GROVE, D. I.; WARREN, K. S. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. **The Journal of Pathology**, v. 121, n. 1, p. 41-50, 1977. ISSN 0022-3417.

MOROWITZ, H.; SMITH, E. Energy flow and the organization of life. **Complexity**, v. 13, n. 1, p. 51-59, 2007. ISSN 1076-2787.

MORRISON, S. J.; SPRADLING, A. C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 598-611, 2008. ISSN 0092-8674.

ODUM, E.; BARRET, G. W. **Fundamentos de Ecologia** 2007.

ODUM, E. P. **Fundamentals of ecology**. WB Saunders company, 1959.

ODUM, E. P. The strategy of ecosystem development. **Science**, v. 164, n. 262.270, 1966.

PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. The formation and function of granulomas. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 639-665, 2018. ISSN 0732-0582.

PAPAYANNOPOULOU, T.; SCADDEN, D. T. Stem-cell ecology and stem cells in motion. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3923-3930, 2008. ISSN 0006-4971.

PATTEN, B. C.; ODUM, E. P. The cybernetic nature of ecosystems. **The American Naturalist**, v. 118, n. 6, p. 886-895, 1981. ISSN 0003-0147.

PEARCE, E. J. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasite Immunology**, v. 27, n. 7-8, p. 265-270, 2005. ISSN 0141-9838.

PEARCE, E. J. et al. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 117-126, 2004. ISSN 0105-2896.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499-511, Jul 2002. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12094224> >.

PEET, R. K. The measurement of species diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 5, n. 1, p. 285-307, 1974. ISSN 0066-4162.

PELTZER, D. A. et al. Understanding ecosystem retrogression. **Ecological Monographs**, v. 80, n. 4, p. 509-529, 2010.

PHILLIPS, S. M. et al. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse: I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation, and host morbidity. **The Journal of Immunology**, v. 118, n. 2, p. 594-599, 1977. ISSN 0022-1767.

PIENTA, K. J. et al. Ecological therapy for cancer: defining tumors using an ecosystem paradigm suggests new opportunities for novel cancer treatments. **Translational Oncology**, v. 1, n. 4, p. 158-164, 2008. ISSN 1936-5233.

PRAGER, B. C. et al. Cancer Stem Cells: The Architects of the Tumor Ecosystem. **Cell Stem Cell**, v. 24, n. 1, p. 41-53, Jan 3 2019. ISSN 1875-9777 (Electronic) 1875-9777 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30609398> >.

RASO, P. et al. *Schistosoma mansoni* granuloma in late evolutive phase, in a case of tumoral form in man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 627-32, Oct 2012. ISSN 1678-9849 (Electronic) 0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152348> >.

RASO, P. et al. Schistosoma mansoni granuloma in late evolutive phase, in a case of tumoral form in man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 627-632, 2012. ISSN 0037-8682.

REIS, L. F. et al. Quantitative and qualitative interferences of pentoxifylline on hepatic Schistosoma mansoni granulomas: effects on extracellular matrix and eosinophil population. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 107-112, 2001. ISSN 0074-0276.

REIS, R. J. N. et al. Esquistossomose mansoni: Diagnóstico pela biópsia retal e parasitológico em 100 casos selecionados. **Revista Brasileira Coloproctologia**, v. 4, n. 2, p. 99-101, 1984.

ROSSI, M. I. D. et al. Extramedullar B lymphopoiesis in liver schistosomal granulomas: presence of the early stages and inhibition of the full B cell differentiation. **International Immunology**, v. 11, n. 4, p. 509-518, 1999. ISSN 1460-2377.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. **Blood Cells**, v. 4, n. 1-2, p. 7-25, 1978. ISSN 0340-4684.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. Schistosoma "Eggs-Itting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2492, 2018. ISSN 1664-3224 (Electronic) 1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30459767> >.

SCHWARTZ, C.; HAMS, E.; FALLON, P. G. Helminth modulation of lung inflammation. **Trends in Parasitology**, 2018. ISSN 1471-4922.

STADECKER, M. J.; WRIGHT, J. A. Distribution and kinetics of mononuclear phagocytes in granulomas elicited by eggs of Schistosoma mansoni. **American Journal of Pathology**, v. 116, n. 2, p. 245, 1984.

STEIDL, C. The ecosystem of classical Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 130, n. 22, p. 2360-2361, 2017. ISSN 0006-4971.

STEINBERG, M. S. Adhesion in development: an historical overview. **Developmental Biology**, v. 180, n. 2, p. 377-388, 1996. ISSN 0012-1606.

SUTHERLAND, R. M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. **Science**, v. 240, n. 4849, p. 177-184, 1988. ISSN 0036-8075.

SWARTZ, J. M. et al. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. **Blood**, v. 108, n. 7, p. 2420-7, Oct 1 2006. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772607> >.

TWEYONGYERE, R. et al. Human eosinophils modulate peripheral blood mononuclear cell response to *Schistosoma mansoni* adult worm antigen in vitro. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 8, p. 516-22, Aug 2016. ISSN 1365-3024 (Electronic) 0141-9838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27169695> >.

ULANOWICZ, R. Mass Energy and Flow in closed ecosystems. **Journal of Theoretical Biology**, v. 34, p. 239-253, 1972. ISSN 0022-5193.

WAGENDORP, T. et al. Land use impact evaluation in life cycle assessment based on ecosystem thermodynamics. **Energy**, v. 31, n. 1, p. 112-125, 2006. ISSN 0360-5442.

WALKER, L. R.; WARDLE, D. A. Plant succession as an integrator of contrasting ecological time scales. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 29, n. 9, p. 504-510, 2014.

WASHINGTON, H. G. Diversity, biotic and similarity indices: a review with special relevance to aquatic ecosystems. **Water Research**, v. 18, n. 6, p. 653-694, 1984. ISSN 0043-1354.

WASSOM, D. L. Immunoecological succession in host-parasite communities. **Journal of Parasitology**, v. 79, n. 4, p. 483-7, Aug 1993. ISSN 0022-3395 (Print) 0022-3395 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8331469> >.

WEINSTOCK, J. V.; BLUM, A. M. Isolated liver granulomas of murine *Schistosoma mansoni* contain components of the angiotensin system. **Journal of Immunology**, v. 131, n. 5, p. 2529-32, Nov 1983. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6195268> >.

Weinstock, J. V.; Blum, A. M. Modulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni by enteric exposure to schistosome ova: in vitro characterization of a regulatory mechanism within the granuloma. **Cellular Immunology**, v. 108, n. 2, p. 452-459, 1987. ISSN 0008-8749.

WHITTAKER, R. H. A consideration of climax theory: the climax as a population and pattern. **Ecological Monographs**, v. 23, n. 1, p. 41-78, 1953. ISSN 1557-7015.

WHITTAKER, R. H. Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. **Ecological Monographs**, v. 30, n. 3, p. 279-338, 1960. ISSN 1557-7015.

WHITTAKER, R. H.; LEVIN, S. A.; ROOT, R. B. Niche, habitat, and ecotope. **The American Naturalist**, v. 107, n. 955, p. 321-338, 1973. ISSN 0003-0147.

WHITTAKER, R. J.; WILLIS, K. J.; FIELD, R. Scale and species richness: towards a general, hierarchical theory of species diversity. **Journal of Biogeography**, v. 28, n. 4, p. 453-470, 2001. ISSN 1365-2699.

WHO. **The Social Context of Schistosomiasis and Its Control**. GENEVA, S. 2008.

WHO. **Schistosomiasis. World Health Organization. Progress report 2001–2011 and strategic plan 2012-2020**. 2011. 80 ISBN ISBN 978 92 4 150317 4.

WHO. <https://www.who.int/schistosomiasis/en/>. 2019. Acesso em: 03 fevereiro.

WOOTTON, J. T.; EMMERSON, M. Measurement of interaction strength in nature. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 36, n. 1, p. 419-444, 2005. ISSN 1543-592X.

WYLER, D. J. et al. Fibroblast stimulation in schistosomiasis. I. Stimulation in vitro of fibroblasts by soluble products of egg granulomas. **Journal of Infectious Diseases**, v. 144, n. 3, p. 254-262, 1981. ISSN 1537-6613.

WYNN, T. A.; BARRON, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. **Seminar in Liver Disease**, v. 30, n. 3, p. 245-57, Aug 2010. ISSN 1098-8971 (Electronic) 0272-8087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20665377> >.

WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, n. 4, p. 505-511, 1995. ISSN 0952-7915.

XU, F. et al. Ecosystem health assessment of Baiyangdian Lake based on thermodynamic indicators. **Procedia Environmental Sciences**, v. 13, n. 1, p. 2402-2413, 2012. ISSN 1878-0296.

YAP, G. et al. Unimpaired down-modulation of the hepatic granulomatous response in CD8 T-cell- and gamma interferon-deficient mice chronically infected with *Schistosoma mansoni*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2583-2586, 1997. ISSN 0019-9567.

YONEYAMA, H.; ICHIDA, T. Recruitment of dendritic cells to pathological niches in inflamed liver. **Medical molecular morphology**, v. 38, n. 3, p. 136-141, 2005. ISSN 1860-1480.