

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza

Kássia Karoline Malta Oliveira

**ECOLOGIA CELULAR DE POPULAÇÕES DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS
DO GRANULOMA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

JUIZ DE FORA

2022

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza

Kássia Karoline Malta Oliveira

**ECOLOGIA CELULAR DE POPULAÇÕES DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS
DO GRANULOMA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte do requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação da Natureza. Área de concentração: Processos ecológicos e Conservação da Natureza.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rossana Correa Netto de Melo

Co-Orientador: Prof. Dr. Thiago Pereira da Silva

JUIZ DE FORA

2022

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

Oliveira, Kássia Karoline Malta.

Ecologia celular de populações de células inflamatórias do granuloma na esquistossomose mansônica / Kássia Karoline Malta Oliveira. -- 2022.

100 p. : il.

Orientadora: Rossana Correa Netto de Melo

Coorientador: Thiago Pereira da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, 2022.

1. Ecologia Celular. 2. Schistosoma mansoni. 3. Granulomas hepáticos e intestinais. 4. População celular e comunidade celular. 5. Riqueza, Similaridade e Diversidade. I. Netto de Melo, Rossana Correa , orient. II. Pereira da Silva, Thiago , coorient. III. Título.

KÁSSIA KAROLINE MALTA OLIVEIRA

Ecologia celular de populações de células inflamatórias do granuloma na esquistossomose mansônica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação da Natureza. Área de concentração: Comportamento, Ecologia e Sistemática

Aprovada em 28 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rossana Corrêa Neto de Melo - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Thiago Pereira da Silva - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Simone Jaqueline Cardoso

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Sthefane D'ávila de Oliveira e Paula

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Juliane Siqueira Francisco

Fundação Oswaldo Cruz

Pr. Dr. Felipe Ferraz Dias

Universidade do Estado de Minas Gerais

Juiz de Fora, 19/12/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Pereira da Silva, Usuário Externo**, em 28/12/2022, às 17:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Jaqueline Cardoso, Professor(a)**, em 28/12/2022, às 18:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliane Siqueira Francisco, Usuário Externo**, em 28/12/2022, às 18:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Ferraz Dias, Usuário Externo**, em 28/12/2022, às 18:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rossana Correa Netto de Melo, Professor(a)**, em 03/01/2023, às 12:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sthefane Davila de Oliveira e Paula, Professor(a)**, em 03/01/2023, às 15:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.uffj.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1084884** e o código CRC **78164C1A**.

À minha mãe,
Familiars, Amigos,
Todos que de certa forma participaram do processo,
Dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

São muitos os motivos para ser grata nesse processo. Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me capacitado em todos os desafios que a pós graduação proporciona. E por me fazer ter fé nos momentos em que me sentia incapaz e não pertencente e tudo o que mais queria era desistir. Consegui chegar até aqui.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, por me oferecer desafios importantes e ampliar minha perspectiva de vida, por gerar novos sonhos e por ser minha casa durante 10 anos de formação. Gratidão.

Agradeço muito a minha mãe por sempre me incentivar a continuar e não desistir dos meus objetivos e me oferecer colo quando processo pesava e me auxiliar na rotina. Ao Yuri por acreditar nos meus sonhos e me incentivar sempre, além de oferecer ajuda sempre quando me sentia sobrecarregada e perdida. A minha psicóloga Flávia, por me ajudar a racionalizar o processo e colocar o pé no chão.

Aos meus orientadores, Rossana e Thiago meu eterno agradecimento. Obrigada por acreditarem em mim quando eu não conseguia. Obrigada pela oportunidade e aprendizado e crescimento, obrigada por serem exemplo de pessoas e profissionais. Obrigada pela orientação e por discutir ideias. Obrigada por incentivar sempre. Ao Thiago, meu muito obrigada por me ouvir sempre quando estava angustiada, e por me ligar sempre quando eu nem sabia que precisava conversar. Obrigada por me ajudar a me organizar. Obrigada pela amizade. Obrigada por tudo!

Agradeço imensamente aos meus colegas de profissão e laboratório. Muitos se tornaram amigos para a vida! Obrigada por tornarem a rotina mais leve, por colaborarem no projeto. Obrigada por estarem junto comigo no processo, principalmente durante a pandemia, quando não tínhamos controle sobre nada e medo o tempo todo. Obrigada por estarem disponíveis para discutir o projeto, discutir ideias e publicações. Sozinhos vamos longe, mas juntos o impossível é possível, minha eterna gratidão! Esse trabalho é nosso, sem vocês nada seria possível! Lívia, Cinthia, Eliane, Yasmin, Julliana, Andreia, Adriana, Lairis, Vitor, Kennedy, Victor, Caique, Felipe, Bruno, Igor! Gratidão.

As minhas amigas Letícia, Sheila, Alexssandra, Bruna, Jéssica, Nathália, Lívia, Camilla, Cirlene, Larissa, Suênia, obrigada pela amizade e por entenderem minhas ausências! Obrigada por tornarem a vida mais leve, pelos bons momentos de lazer e lanches gostosos. Obrigada por escutarem minhas angústias e por dizerem que tudo daria certo. Amigos que não foram citados, não se sintam menos importantes, minhas sinceras desculpas pois mais uma vez deixei pra última hora.

Agradeço a minha família pelo suporte de sempre. Por me acolherem em momentos de descontração e descanso. Obrigada por estarem sempre juntos em minha formação e oferecer suporte nos desafios. Aos meus afilhados por tornarem a vida mais leve com a inocência das crianças! À minha avó e por seu carinho imenso pela universidade e as potências que ela gera, mesmo sem nem ter estado lá. Às minhas tias que sempre vibraram e oraram por meu processo.

Agradeço ao PPG Biodiversidade por contribuir em minha formação profissional e pessoal. Obrigada a todos os docentes, coordenadores, colegas discentes e as secretárias

Rosi, Priscila, Dayane e Marlú sempre dispostas a ajudar. A coordenação e representantes discentes, obrigada por trabalharem em conjunto para promover um espaço de acolhida.

As agências de fomento que financiaram a execução desse trabalho, CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFJF e que pagaram meu salário. Finalizo com o coração repleto de gratidão por todos os desafios dessa trajetória, a todos os parceiros que estiveram comigo, por todas as trocas, todos os aprendizados que me trouxeram até aqui. Que venham os próximos!

**“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”**

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A esquistossomose, doença tropical negligenciada, afeta humanos por séculos e permanece um grave problema de saúde pública, com altos índices de morbidade e mortalidade. Existe atualmente cerca de 240 milhões de pessoas infectadas no mundo e 700 milhões em risco de infecção em 78 países. A esquistossomose é considerada uma doença multifatorial com aspectos ambientais, comportamentais, parasitários e associados aos hospedeiros. A principal característica histopatológica da doença é a formação de granulomas ao redor dos ovos do parasito em órgãos-alvo de hospedeiros vertebrados. Os granulomas têm sido descritos como sistemas dinâmicos, multifacetados e auto-organizados com componentes do hospedeiro e do parasito. No entanto, o funcionamento dos granulomas, em diferentes órgãos-alvo, e como conter seu desenvolvimento ainda é pouco entendido. No presente trabalho, estudamos os granulomas sob o ponto de vista da ecologia celular. Classicamente, a ecologia é uma ciência interdisciplinar, moderna e ativa, que estuda comportamentos e interações dos organismos entre si e com o meio ambiente. No entanto, as perspectivas ecológicas não estão limitadas a apenas uma escala espacial e também podem ser aplicadas a células e moléculas. Aqui, propomos que o granuloma hepático causado pelo parasito *S. mansoni* atua como um ecossistema formado através do processo de sucessão ecológica. Alinhados com conceitos ecológicos, examinamos o granuloma não apenas como um local onde se estabelece uma comunidade de células (nicho espacial ou habitat), mas também como um local no qual as atividades funcionais dessas populações combinadas ocorrem de forma orquestrada em resposta a gradientes microambientais como citocinas e antígenos de ovo. Exploramos também os possíveis papéis que eosinófilos podem desempenhar nos granulomas, visto que é uma das populações mais abundantes nesses ecossistemas, cujos papéis funcionais permanecem obscuros e até mesmo controversos. Além disso, investigamos aspectos da composição e estrutura da comunidade celular de granulomas intestinais e hepáticos e seu desenvolvimento espaço-temporal durante a infecção experimental por *S. mansoni*. Com a aplicação da técnica *Whole Slide Imaging* (WSI) e análises ecológicas, mostramos pela primeira vez, a dinâmica espaço-temporal das comunidades celulares de granulomas intestinais e hepáticos. Nós mostramos que as populações celulares variam em quantidade de acordo com o órgão (fígado ou intestino) e o estágio evolutivo do granuloma. Investigamos também a similaridade e diversidade celular nos granulomas. Granulomas de mesmo órgão em estágios evolutivos diferentes são mais similares que granulomas de órgãos diferentes de mesmo estágio evolutivo. Granulomas intestinais apresentam maior diversidade que granulomas hepáticos. Identificamos também interações celulares, principalmente entre eosinófilos e plasmócitos com potenciais papeis funcionais. Nossos resultados ampliam o entendimento da dinâmica espaço-temporal das populações celulares nos granulomas. O melhor entendimento do granuloma esquistossomótico como um sistema ecológico pode ser a chave para desvendar a complexidade dessa resposta inflamatória e guiar futuro tratamento da doença.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*; granulomas intestinais; granulomas hepáticos; ecologia celular; ecossistema; interações celulares; comunidade celular; população celular; riqueza; diversidade; similaridade.

ABSTRACT

Schistosomiasis, a neglected parasitic infection, has affected humans for centuries and remains a serious public health problem, with high rates of morbidity and mortality. Currently, there are around 240 million people infected worldwide and 700 million at risk of infection in 78 countries. Schistosomiasis is considered a multifactorial disease with environmental, behavioral, parasitic and host-associated aspects. The main histopathological feature of the disease is the formation of granulomas around the parasite eggs in target organs of vertebrate hosts. Granulomas have been described as dynamic, multifaceted and self-organizing systems with both host and parasite components. However, the functioning of granulomas, in different target organs, and how to restrain their development is still poorly understood. In the present work, we studied granulomas from the point of view of cellular ecology. Classically, ecology is an interdisciplinary, modern, and active science that studies the behavior and interactions of organisms with each other and with the environment. However, ecological perspectives are not limited to just a spatial scale and can also be applied to cells and molecules. In the present work, we studied granulomas from the point of view of cellular ecology. Here, we propose that the hepatic granuloma caused by the parasite *S. mansoni* acts as an evolving ecosystem. In line with ecological concepts, we examine the granuloma not only as a site where a community of cells is established, but also as a site where the functional activities of these combined populations occur in an orchestrated way in response to microenvironmental gradients, such as cytokines and egg antigens. We also explored the possible roles that eosinophils can play in granulomas. These cells are one of the most abundant populations in granuloma, whose functional roles remain unclear and even controversial. Furthermore, we investigated aspects of the composition and structure of the cellular community of intestinal and hepatic granulomas and their spatial-temporal development during experimental infection with *S. mansoni*. With the application of the Whole Slide Imaging (WSI) technique and ecological analyses, we show for the first time the space-time dynamics of the cellular communities of intestinal and hepatic granulomas. We found that the cell populations vary in quantity according to the organ (liver or intestine) and the evolutionary stage of the granuloma. We also investigated the similarity and cellular diversity in the granulomas. Granulomas from the same organ at different evolutionary stages are more similar than granulomas from different organs at the same evolutionary stage. Intestinal granulomas are more diverse than hepatic granulomas. We also identified cellular interactions, mainly between eosinophils and plasma cells with potential functional roles. Our results broaden the understanding of the spatiotemporal dynamics of cell populations in granulomas. A better understanding of the schistosomal granuloma as an ecological system may be the key to unveil the complexity of this inflammatory response and guide future treatment of the disease.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; intestinal granulomas; hepatic granulomas; cellular ecology; ecosystem; cellular interactions; cell community; cell population; richness; diversity; similarity.

DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

A esquistossomose, popularmente conhecida como “barriga d’água” é uma doença parasitária de grande importância mundial. Ela é chamada de negligenciada por ocorrer em países tropicais, emergentes e subdesenvolvidos e não ser prioritária para o desenvolvimento de políticas públicas. No hospedeiro mamífero, como nós humanos, os parasitos adultos habitam vasos sanguíneos localizados próximos ao intestino e ali eles se reproduzem e chegam a produzir cerca de 300 ovos por dia, que podem ser eliminados com as fezes, mas principalmente são carregados pela corrente sanguínea para o fígado, onde ficam presos em pequenas veias, obstruindo a corrente sanguínea e, levando ao aumento do fígado e baço, características que dão nome à doença. Os ovos do parasito representam o principal fator de agravamento da doença pois eles ficam presos em órgãos importantes do corpo, como fígado e intestino e ali desencadeiam uma intensa resposta do sistema imune, formando o que chamamos de granulomas, uma inflamação com formato de pequenos nódulos. Os granulomas podem beneficiar ou prejudicar o hospedeiro. Eles são responsáveis por empurrar os ovos pelo intestino para serem eliminados junto com as fezes. No fígado, os granulomas são responsáveis por isolar os ovos e as substâncias tóxicas por eles liberados que podem matar as células do fígado, desta forma protegendo o hospedeiro. Mas o granuloma é uma reação muito forte que causa fibrose, uma cicatriz, que pode levar a perda de função dos órgãos e conseqüentemente a morte do hospedeiro. Em nosso laboratório, nós estudamos os granulomas a fim de entender como ele se forma e possivelmente identificar novas estratégias de tratamento da doença. Para nós, os granulomas funcionam como o ecossistema na natureza onde as células são as plantas e os animais que habitam determinado ambiente e nele interagem. Nós estudamos como as células se comportam durante a formação do granuloma e também como elas interagem com o meio. Entender isso tudo faz parte do processo de identificar um novo alvo para produção de remédios e vacinas para a esquistossomose que ainda infecta muita gente no mundo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REFERÊNCIAS	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.1 Objetivos específicos	21
4 CAPÍTULO 1- Changing our view of the schistosoma granuloma to an ecological STANDPOINT	22
4.1 Primeira publicação	23
5 CAPÍTULO 2- Schistosomiasis mansoni-recruited eosinophils: An overview in the granuloma context	40
5.1 Segunda publicação	41
6 CAPÍTULO 3- Aspectos descritivos espaço-temporais da comunidade celular dos granulomas intestinais e hepáticos durante a esquistossomose mansoni experimental	59
7 INTRODUÇÃO	60
8 MATERIAL E MÉTODOS	63
8.2.1 Animais e infecção experimental	63
8.2.2 Eutanásia e coleta de amostras	63
8.2.3 Comitê de ética	63
8.2.4 Técnicas histológicas.....	64
8.2.4.1 Inclusão em resina glicolmetacrilato (GMA)	64
8.2.4.2 Microtomia e coloração	64
8.2.5 <i>Whole Slide Imaging</i> (WSI).....	65
8.2.6 Média de granuloma por órgão-alvo e estágio evolutivo	66
8.2.7 Classificação morfológica dos granulomas em estágios evolutivos.....	67
8.2.8 Identificação e classificação das células imunes para delimitação de populações celulares	67
8.2.9 Avaliação ecológica da estrutura da comunidade celular nos granulomas hepáticos e intestinais	70

8.2.9.1 Avaliação espaço-temporal quantitativa das populações celulares dos granulomas	70
8.2.9.2 Avaliação da diversidade na composição da comunidade celular dos granulomas	71
8.2.10 Processamento das amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET)	72
8.2.11 Análises estatísticas	73
9 RESULTADOS	74
9.1 Ocorrência de granulomas esquistossomóticos no intestino grosso e fígado de camundongos experimentalmente infectados.....	74
9.2 Comunidade de células inflamatórias nos granulomas.....	77
9.3 Abundância populacional nos granulomas hepáticos e intestinais.....	79
9.4 Densidade das populações na comunidade celular dos granulomas.....	83
9.5 Análises ecológicas de estrutura da comunidade celular dos granulomas	84
9.6 Populações celulares estabelecem íntima interação nos granulomas	87
10 DISCUSSÃO	89
11 CONCLUSÕES.....	95
12 REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO GERAL

Classicamente, a ecologia é uma ciência interdisciplinar, moderna e ativa, que estuda comportamentos e interações dos organismos entre si e com o meio ambiente. No entanto, as perspectivas ecológicas não estão limitadas a apenas uma escala espacial e também podem ser aplicadas a células e moléculas (LACINA; KODET; DVOŘÁNKOVÁ; SZABO *et al.*, 2018). Estudos recentes têm aplicado visões paralelas entre ecologia e biologia celular para melhor entender o comportamento de populações celulares e suas respostas em uma perspectiva ecológica (KAREVA, 2011; 2015; LACINA; KODET; DVOŘÁNKOVÁ; SZABO *et al.*, 2018). Esses estudos emprestam termos e conceitos da ecologia para definir e compreender as interações celulares relacionadas à fisiologia e patologia (LACINA; KODET; DVOŘÁNKOVÁ; SZABO *et al.*, 2018; STEIDL, 2017). De fato, diversos paralelos entre as estruturas organoides e sistemas ecológicos são reconhecidos desde a década de 1970 (DE SOUSA, 1973; GATENBY, 1991; STEIDL, 2017). Historicamente, a interdisciplinaridade entre a Ecologia e a Biologia Celular tem sido importante para fornecer percepções vitais na compreensão das relações parasito-hospedeiro (HOTEZ, 2017; PENCZYKOWSKI; PARRATT; BARRÈS; SALLINEN *et al.*, 2018; WASSOM, 1993). Ao combinar essas disciplinas em contextos de estudos de sistemas biológicos, surge a ecologia celular, que consiste no estudo de interações e comportamentos de células e moléculas sob a ótica da ecologia.

A esquistossomose, doença tropical negligenciada, afeta humanos por séculos e permanece um grave problema de saúde pública, com altos índices de morbidade e mortalidade (BURKE; JONES; GOBERT; LI *et al.*, 2009). A esquistossomose é considerada uma doença multifatorial que inclui fatores ambientais, comportamentais, parasitários e dos hospedeiros (BURKE; JONES; GOBERT; LI *et al.*, 2009; WHO, 2011). De acordo com a organização mundial de saúde (OMS), a esquistossomose é a segunda doença parasitária em importância socioeconômica mundialmente, atrás apenas da malária. Ela é causada por trematódeo sanguíneo do gênero *Schistosoma* pertencente à família Schistosomatidae. Em seu ciclo de vida heteroxênico, estão envolvidos o hospedeiro intermediário invertebrado (molusco) e o hospedeiro definitivo vertebrado (mamífero) (ELBAZ; ESMAT, 2013; GRYSEELS; POLMAN; CLERINX; KESTENS, 2006).

Os humanos são infectados após a exposição à água contaminada e não é surpreendente que, sendo uma doença de origem hídrica, a expansão da esquistossomose tenha se distribuído de acordo com os fluxos migratórios humanos (STEINMANN; KEISER; BOS; TANNER *et al.*, 2006). A África continua sendo o continente mais afetado, mas as infecções persistem na América do Sul, Ásia e, mais recentemente, na França (BERRY; FILLAUX; MARTIN-BLONDEL; BOISSIER *et al.*, 2016; ROLLINSON; KNOPP; LEVITZ; STOTHARD *et al.*, 2013; WHO, 2011).

A esquistossomose tem um extenso histórico de pesquisas com avanços científicos importantes, mas ainda há muito a aprender sobre esta doença, principalmente no que diz respeito a melhorias no tratamento e desenvolvimento de vacinas (COLLEY; SECOR, 2007; HOTEZ, 2017). Desde 1970, o praziquantel, apesar da eficácia incompleta, não prevenir reinfeção e da possibilidade de resistência, tem sido o medicamento de escolha no tratamento da esquistossomose e até o momento não há vacina eficaz disponível contra essa doença (MCMANUS; DUNNE; SACKO; UTZINGER *et al.*, 2018).

A esquistossomose é uma doença paradoxal em sua patologia. Em resposta ao parasito, estruturas contendo coleções extraordinariamente organizadas de células inflamatórias e residentes são estabelecidas ao redor de ovos do parasito depositados em órgãos-alvo. Tais estruturas, denominadas granulomas, representam a característica patológica mais proeminente da esquistossomose (CHUAH; JONES; BURKE; MCMANUS *et al.*, 2014; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Os granulomas são considerados estruturas protetoras que surgem como resultado da estimulação antigênica persistente (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018). Em particular, os granulomas protegem o hospedeiro das toxinas secretadas pelos ovos do parasito. Paradoxalmente, embora os granulomas atuem para minimizar os danos aos tecidos, fornecendo uma barreira física entre o ovo e o tecido circundante, eles também são a principal causa da patologia em indivíduos infectados com subsequente formação de fibrose e cicatrizes (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Sob o ponto de vista do parasito, os granulomas intestinais são responsáveis por atravessarem os ovos pelo epitélio até a luz intestinal do hospedeiro, garantindo assim a continuidade de seu ciclo de vida (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

O granuloma esquistossomótico é um exemplo notável de como os parasitos podem evoluir com seus hospedeiros para estabelecer associações íntimas e complexas.

Granulomas formados durante a esquistossomose foram descritos como sistemas dinâmicos, auto-organizados e multifacetados com componentes do hospedeiro e do parasito, possuindo papéis protetores ao hospedeiro e benéficos ao parasito (LENZI; KIMMEL; SCHECHTMAN; PELAJO-MACHADO *et al.*, 1998; LENZI; ROMANHA; SANTOS; ROSAS *et al.*, 2006). A pesquisa em granulomas durante a esquistossomose mansônica tem abordado vários aspectos dessas estruturas, principalmente sua composição celular/molecular, natureza das respostas inflamatórias e consequências danosas para o hospedeiro, mas muitas questões permanecem sem respostas e ainda faltam estratégias para conter o desenvolvimento do granuloma.

Além dos nossos estudos patológicos (AMARAL; SILVA; DIAS; MALTA *et al.*, 2017; AMARAL; SILVA; MALTA; CARMO *et al.*, 2016; DIAS; AMARAL; MALTA; SILVA *et al.*, 2018), nosso grupo de pesquisa propôs recentemente que o granuloma atua como um ecossistema celular integrado e em evolução e que pode funcionar muito além de um simples sistema biológico resultante da resposta do organismo à infecção (OLIVEIRA, 2019). No entanto, aspectos como a diversidade e distribuição espacial das populações celulares na formação sucessional do granuloma são ainda muito pouco entendidos. Além disso, aspectos funcionais de populações celulares dominantes no granuloma como as de eosinófilos e macrófagos, sob o ponto de vista ecológico ainda não foram definidos. Essa visão ecológica do granuloma levanta possibilidades para melhor entendimento tanto da imunopatologia da doença como da dinâmica de comunidades de células e suas interações entre si e com o microambiente do granuloma.

Desta forma, no presente trabalho pretendemos investigar a estrutura da comunidade celular dos granulomas hepáticos e intestinais em camundongos experimentalmente infectados com uma abordagem inovadora do granuloma como ecossistema no contexto da esquistossomose mansônica.

2 REFERÊNCIAS

AMARAL, K. B.; SILVA, T. P.; DIAS, F. F.; MALTA, K. K. *et al.* Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. **PloS one**, 12, n. 9, p. e0184696, 2017.

AMARAL, K. B.; SILVA, T. P.; MALTA, K. K.; CARMO, L. A. S. *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**, 11, n. 11, p. e0166979, 2016.

BERRY, A.; FILLAUX, J.; MARTIN-BLONDEL, G.; BOISSIER, J. *et al.* Evidence for a permanent presence of schistosomiasis in Corsica, France, 2015. **Eurosurveillance**, 21, n. 1, p. 30100, 2016.

BURKE, M. L.; JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; LI, Y. S. *et al.* Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite immunology**, 31, n. 4, p. 163-176, 2009.

CHUAH, C.; JONES, M. K.; BURKE, M. L.; MCMANUS, D. P. *et al.* Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in parasitology**, 30, n. 3, p. 141-150, 2014.

COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. A schistosomiasis research agenda. **PLoS neglected tropical diseases**, 1, n. 3, p. e32, 2007.

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

DIAS, F. F.; AMARAL, K. B.; MALTA, K. K.; SILVA, T. P. *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**, 9, p. 3019, 2018.

ELBAZ, T.; ESMAT, G. Hepatic and intestinal schistosomiasis: review. **Journal of advanced research**, 4, n. 5, p. 445-452, 2013.

GATENBY, R. A. Population ecology issues in tumor growth. **Cancer research**, 51, n. 10, p. 2542-2547, 1991.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **The Lancet**, 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The schistosoma granuloma: friend or foe? **Frontiers in immunology**, 4, p. 89, 2013.

HOTEZ, P. J. The poverty-related neglected diseases: Why basic research matters. **PLoS biology**, 15, n. 11, p. e2004186, 2017.

KAREVA, I. What can ecology teach us about cancer? **Translational oncology**, 4, n. 5, p. 266-270, 2011.

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

LACINA, L.; KODET, O.; DVOŘÁNKOVÁ, B.; SZABO, P. *et al.* Ecology of melanoma cell. **Histology and histopathology**, p. 247-254, 2018.

LENZI, H. L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M. *et al.* Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, 93, n. 1, p. 141-151, 1998.

LENZI, H. L.; ROMANHA, W. S.; SANTOS, R. M.; ROSAS, A. *et al.* Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: fractal arrangement, internal regulation, autopoietic component and closure. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, 101, n. 1, p. 219-231, 2006.

MCMANUS, D. P.; DUNNE, D. W.; SACKO, M.; UTZINGER, J. *et al.* Schistosomiasis. **Nature reviews disease primers**, 13, n. 4, p. 1-19, 2018.

OLIVEIRA, K. K. M. **Populações celulares em granulomas esquistossomóticos: biologia celular em uma perspectiva ecológica**. 2019. (Mestrado). Universidade Federal de Juiz de Fora.

PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. The formation and function of granulomas. **Annual review of immunology**, 36, p. 639-665, 2018.

PENCZYKOWSKI, R. M.; PARRATT, S. R.; BARRÈS, B.; SALLINEN, S. K. *et al.* Manipulating host resistance structure reveals impact of pathogen dispersal and environmental heterogeneity on epidemics. **Ecology**, 99, n. 12, p. 2853-2863, 2018.

ROLLINSON, D.; KNOPP, S.; LEVITZ, S.; STOTHARD, J. R. *et al.* Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. **Acta tropica**, 128, n. 2, p. 423-440, 2013.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. Schistosoma "Eggs-Itting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Frontiers in Immunology**, 9, p. 2492, 2018.

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

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M. *et al.* Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet infectious diseases**, 6, n. 7, p. 411-425, 2006.

WASSOM, D. L. Immunoecological succession in host-parasite communities. **The journal of parasitology**, p. 483-487, 1993.

WHO. Schistosomiasis: progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020. Department of Control of Neglected Tropical Diseases Geneva, Switzerland: 74 p. 2011.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar, sob o ponto de vista da Ecologia Celular, a distribuição e o comportamento de populações de células inflamatórias em granulomas hepáticos e intestinais no espaço-tempo durante a infecção experimental por *Schistosoma mansoni*.

3.2 Objetivos Específicos

- Explorar o granuloma hepático induzido pela infecção por *Schistosoma mansoni* à luz da Ecologia celular, como potencial ecossistema no contexto tecidual.
- Discutir a atividade funcional da população de eosinófilos nos granulomas esquistossomóticos como células dominantes e importantes para a construção e desenvolvimento destas estruturas.
- Investigar aspectos da composição e estrutura da comunidade celular de granulomas intestinais e hepáticos e seu desenvolvimento espaço-temporal durante a infecção experimental por *Schistosoma mansoni*.

Para melhor compreensão, esta tese foi dividida em três capítulos apresentados na forma de artigos científicos. Os dois primeiros capítulos referem-se à artigos já publicados em periódicos internacionais enquanto o terceiro capítulo incorpora artigo a ser submetido, conforme abaixo.








4 CAPÍTULO 1

Changing our view of the *Schistosoma granuloma* to an ecological standpoint

Este capítulo é composto pela publicação no periódico *Biological Reviews* (FI: 14.35 Qualis A1). Ele foi reproduzido no presente trabalho com autorização.

Neste capítulo, exploramos o granuloma hepático causado por *Schistosoma mansoni* à luz da Ecologia e propomos que essa intrincada estrutura atua como um verdadeiro ecossistema. Alinhados com conceitos ecológicos, examinamos o granuloma não apenas como um local onde se estabelece uma comunidade de células (nicho espacial ou habitat), mas também como um local no qual as atividades funcionais dessas populações combinadas ocorrem de forma orquestrada em resposta a gradientes microambientais como citocinas e antígenos de ovo. O trabalho discute que os níveis de organização dos componentes celulares em um granuloma como convencionalmente definidos pela Biologia Celular podem se encaixar perfeitamente em uma estrutura hierárquica de sistemas biológicos conforme definida pela Ecologia. Ao repensar o granuloma como um ecossistema integrador e em evolução, chamamos a atenção para o funcionamento interno dessa estrutura que é central para a compreensão da esquistossomose e pode orientar seu tratamento futuro.

Changing our view of the *Schistosoma* granuloma to an ecological standpoint

Kássia K. Malta^{1,2} , Thiago P. Silva^{1,2} , Cinthia Palazzi^{1,3} , Vitor H. Neves^{1,3} ,
Lívia A. S. Carmo^{1,4} , Simone J. Cardoso^{2,5}  and Rossana C. N. Melo^{1,2,3*} 

¹Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, São Pedro, Juiz de Fora, MG, 36036-900, Brazil

²Graduate Program in Biodiversity, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, São Pedro, Juiz de Fora, MG, 36036-900, Brazil

³Graduate Program in Cell Biology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil

⁴Department of Medicine, Federal University of Alagoas, Rodovia AL-115, Bom Sucesso, Arapiraca, AL, 57309-005, Brazil

⁵Laboratory of Plankton Ecology, Department of Zoology, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, São Pedro, Juiz de Fora, MG, 36036-900, Brazil

ABSTRACT

Schistosomiasis, a neglected parasitic tropical disease that has plagued humans for centuries, remains a major public health burden. A primary challenge to understanding schistosomiasis is deciphering the most remarkable pathological feature of this disease, the granuloma – a highly dynamic and self-organized structure formed by both host and parasite components. Granulomas are considered a remarkable example of how parasites evolved with their hosts to establish complex and intimate associations. However, much remains unclear regarding life within the granuloma, and strategies to restrain its development are still lacking. Here we explore current information on the hepatic *Schistosoma mansoni* granuloma in the light of Ecology and propose that this intricate structure acts as a real ecosystem. The schistosomal granuloma is formed by cells (biotic component), protein scaffolds, fibres, and chemical compounds (abiotic components) with inputs/outputs of energy and matter, as complex as in classical ecosystems. We review the distinct cell populations ('species') within the granuloma and examine how they integrate with each other and interact with their microenvironment to form a multifaceted cell community in different space–time frames. The colonization of the hepatic tissue to form granulomas is explained from the point of view of an ecological succession whereby a community is able to modify its physical environment, creating conditions and resources for ecosystem construction. Remarkably, the granuloma represents a dynamic evolutionary system that undergoes progressive changes in the 'species' that compose its community over time. In line with ecological concepts, we examine the granuloma not only as a place where a community of cells is settled (spatial niche or habitat) but also as a site in which the functional activities of these combined populations occur in an orchestrated way in response to microenvironmental gradients such as cytokines and egg antigens. Finally, we assert how the levels of organization of cellular components in a granuloma as conventionally defined by Cell Biology can fit perfectly into a hierarchical structure of biological systems as defined by Ecology. By rethinking the granuloma as an integrating and evolving ecosystem, we draw attention to the inner workings of this structure that are central to the understanding of schistosomiasis and could guide its future treatment.

Key words: cellular ecology, host–parasite interaction, ecosystem, granuloma, *Schistosoma mansoni*, schistosomiasis, neglected tropical diseases, ecology, ecological succession

CONTENTS

I. Introduction	2
II. Architecture of the hepatic granuloma – a classical view	2

* Author for correspondence at address 1 (Tel: +55 32 2102 3236; E-mail: rossana.melo@ufjf.edu.br)

III. Integrated cell populations inhabiting granulomas	7
IV. Colonization by the cell community during granuloma formation: an ecological succession	9
V. Granuloma and ecological niche	10
VI. The <i>Schistosoma</i> granuloma: a real ecosystem?	12
VII. Conclusions	13
VIII. Acknowledgements and author contributions	13
IX. References	14

I. INTRODUCTION

Schistosomiasis is an ancient disease but it remains one of the most common parasitic diseases worldwide with substantial morbidity and mortality (di Bella *et al.*, 2018; Schwartz & Fallon, 2018). Global public health efforts have been made to control this neglected tropical disease that is currently endemic in 78 countries and affects more than 230 million people (WHO, 2011; Colley, Andros & Campbell, 2017). Schistosomiasis is caused by trematode worms of the genus *Schistosoma*, which have a peculiar life cycle involving an aquatic snail intermediate host and a definitive mammalian host (Colley *et al.*, 2014; McManus *et al.*, 2018). Humans become infected following exposure to contaminated water and it is not surprising that, as a water-based disease, the expansion of schistosomiasis has tracked human migratory flows (Steinmann *et al.*, 2006). Africa remains the most severely affected continent, but infections persist in South America, Asia and more recently in France (WHO, 2011; Rollinson *et al.*, 2013; Berry *et al.*, 2016).

Schistosomiasis has an extensive history of research with important scientific advances but there is still much to learn about this disease, especially regarding fundamentals such as better treatment and vaccine development (Colley & Secor, 2007; Hotez, 2017). Since 1970, praziquantel, despite incomplete efficacy and the possibility of resistance, has been the chemotherapy of choice in treating schistosomiasis and so far there is no effective vaccine available against this disease (McManus *et al.*, 2018).

Schistosomiasis is a paradoxical disease regarding its pathology. In response to the parasite, sites containing extraordinarily organized collections of inflammatory and resident cells are settled around parasite eggs deposited in target organs. These sites, termed granulomas, are the most prominent pathological feature of schistosomiasis (Hams, Aviello & Fallon, 2013; Chuah *et al.*, 2014). Granulomas are considered to be protective structures that arise as result of persistent antigenic stimulation (Pagán & Ramakrishnan, 2018). In particular, granulomas protect the host from toxins secreted by schistosome eggs. Paradoxically, although granulomas act to minimize tissue damage by providing a physical barrier between the egg and the surrounding tissue, they are also the main cause of pathology in infected individuals with subsequent formation of fibrosis and scarring (Hams *et al.*, 2013).

The *Schistosoma* granuloma provides a remarkable example of how parasites can evolve with their hosts to establish complex and intimate associations. Granulomas formed

during schistosomiasis have been described as dynamic, self-organized, and multifaceted systems with both host and parasite components and host-protective and parasite-beneficial roles (Lenzi *et al.*, 1998, 2006). Research on *Schistosoma* granulomas has addressed several aspects of these structures, mainly their cellular/molecular composition, nature of inflammatory responses and damaging consequences, but many questions remain and strategies to restrain granuloma development are still lacking.

Ecology and Cell Biology have both provided vital insights into the understanding of host–parasite relationships (Wassom, 1993; Hotez, 2017; Penczykowski *et al.*, 2018). By combining these disciplines in the context of granulomas from hepatic *Schistosoma mansoni* infection, one of the most prevalent forms of this disease (McManus *et al.*, 2018), we offer here a new view of *Schistosoma* granulomas as finely tuned ecosystems. By using a perspective that considers the granuloma in its entirety, we may be able to achieve a better understanding of schistosomiasis and to improve strategies for therapy.

II. ARCHITECTURE OF THE HEPATIC GRANULOMA – A CLASSICAL VIEW

Hepatic involvement is a hallmark of schistosomiasis caused by *Schistosoma mansoni* [reviewed in Wynn *et al.* (2004), Gryseels *et al.* (2006), Colley *et al.* (2014) and McManus *et al.* (2018)]. 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.*, 2014; Schwartz & Fallon, 2018). Granulomas occupy an extensive area of the infected liver, triggering severe hepatic fibrosis, hepatosplenomegaly and portal hypertension, and can lead to death (Andrade, 2009; Chuah *et al.*, 2014; Colley *et al.*, 2014).

Based on histopathological findings, at least two main stages are recognized in the process of granuloma formation in the liver of experimental models and humans: a pre-granulomatous stage characterized by early influx and arrangement of cells around the eggs; and a granulomatous stage with distinct subtypes, in which the granuloma progresses from a maturative to an involuntional state (Fig. 1A) (Hsü *et al.*, 1972a; Lenzi *et al.*, 1998; Raso *et al.*, 2012; Chuah *et al.*, 2014).

Schistosomal granulomas have variable size and cellular composition depending on their stage of development (Fig. 1A, B). A spectrum of immune and resident cells, such as lymphocytes, macrophages, eosinophils, neutrophils, and fibroblasts, colonize these granulomas (Table 1). These cells are sequentially recruited to the granuloma and, once at this site, arrange themselves into tightly clustered and vigorous populations with varied lifespan and poorly understood functional roles (Table 1) (Chuah *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2020).

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. A mature granuloma (Fig. 1A) shows a remarkable internal architecture with well-defined boundaries. The granuloma is organized into zones where different types of cells combine compactly to form well-delimited layers around the parasite egg (Lenzi *et al.*, 1999). Resident cells (Table 1) such

as fibroblasts and hepatic stellate cells (HSCs) gradually produce a large amount of extracellular matrix (ECM) fibres, with two different types of collagen fibres appearing successively and evolving to a final compact and concentric arrangement (Lenzi *et al.*, 1999) while elastic fibres also define different topographic areas within the granuloma (Lenzi *et al.*, 2006).

Different patterns of production and deposition of ECM components can be identified during granuloma development. Three-dimensional (3D) analyses and other methodological approaches have revealed the arrangement of these components into three regions, which are very well defined in the granuloma subtype termed exudative–productive (EP; Fig. 1A): external or peripheral, medial or intermediate, and central or periovar (Lenzi *et al.*, 1998, 1999, 2006). For example, the collagen fibres have a looser arrangement in the peripheral zone, and a more compact and circumferential organization with fibre radiation centres in the medial region, whereas the central zone has few and delicate fibres, being devoid of collagen in the periovar subregion (Lenzi *et al.*, 2006). Interestingly, the cell

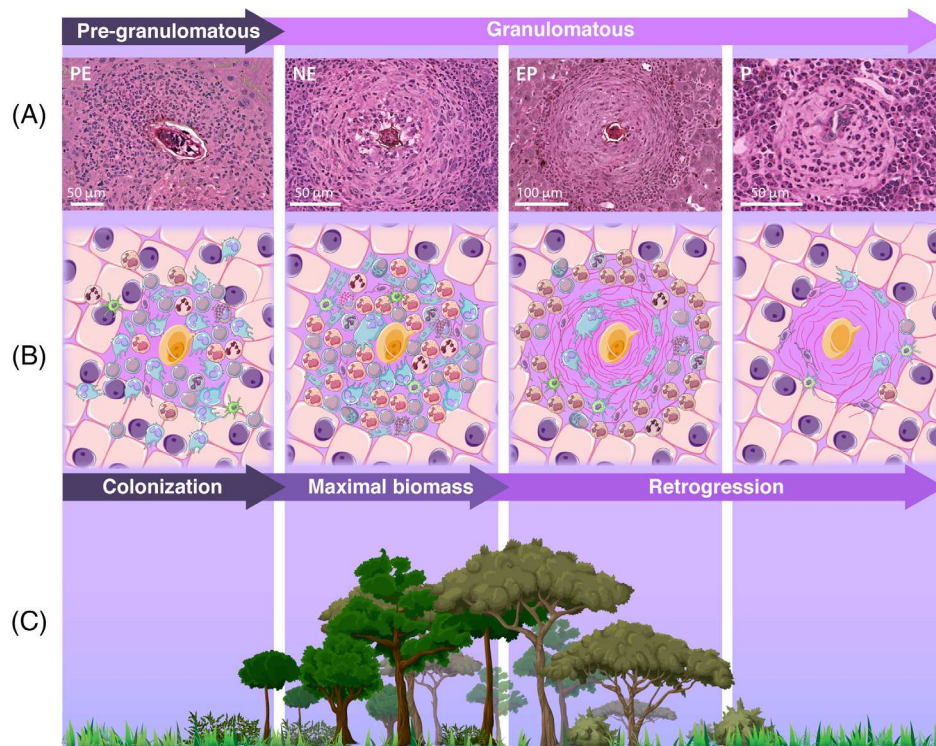

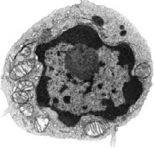

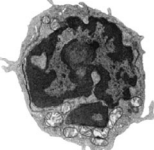
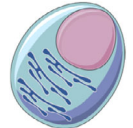
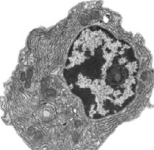
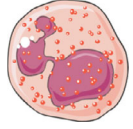
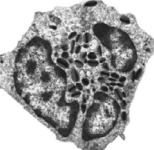


Fig 1. Ecological succession in a hepatic *Schistosoma* granuloma. (A) Granuloma development in the liver during *Schistosoma mansoni* infection follows an initial disordered phase (pre-granulomatous stage) to a highly organized cell assembly (granulomatous stage) in which the granuloma progresses from a maturative to an involutional state. From a cell biological/pathological viewpoint, the granuloma undergoes the following stages/types (Amaral *et al.*, 2017): pre-granulomatous exudative (PE), characterized by initial colonization/organization by ‘pioneer’ inflammatory cells around the parasite egg; necrotic–exudative (NE) presenting a higher density and complexity of inflammatory cells (maximal biomass) that are spatially well organized within the granuloma; exudative–productive (EP), with a rich structure of collagen fibres and inflammatory cells concentrated in the periphery; and productive (P), with a typical thick band of collagen fibres between the egg and few inflammatory cells (retrogression). Liver sections were stained with hematoxylin–eosin and examined under a light microscope. (B) Graphical representation highlighting the cell populations and structural components during the granuloma ‘evolutionary events’. (C) The ‘evolution’ of the granuloma can be related to an ecological succession of plant ecosystems, where after a colonization phase with pioneer species, the system reaches maximal biomass and then undergoes retrogression. Thus, the granuloma can be seen as representing a dynamic evolutionary system that undergoes progressive changes in the ‘species’ that comprise its community over time.

Table 1. Cell populations within a hepatic *Schistosoma* granuloma

Cell populations	Morphological features	Possible roles*	Refs
<p>T-lymphocytes</p>  	<p>Small cells with a single round nucleus occupying most of the cytoplasm (high nucleus-to-cytoplasmic volume ratio). Comprise several T-cell subpopulations: CD4+ T helper (Th) cells (Th1, Th2, Th17, follicular helper T cell (Tfh), Th9, regulatory T cells (Tregs) and CD8+ cytotoxic T cells, which have distinct antigen expression patterns.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Recruitment of other inflammatory cells to granuloma sites - Promotion and maintenance of the granuloma and fibrogenesis - Immunosuppressive role 	<p>(1) (2) (3) (4) (5)</p>
<p>B-lymphocytes</p>  	<p>Cells with a single round nucleus showing a high nucleus-to- cytoplasmic volume ratio. B-cells are larger in diameter than T-cells and can be defined by antigen expression.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Regulation of T cell functions, immune polarization (Th2) and survival - Down-regulation of granulomatous inflammation and fibrosis - Reduction of granuloma growth 	<p>(6) (7) (8) (9)</p>
<p>Plasma cells</p>  	<p>Cells showing an eccentric round nucleus with evident nucleolus and marginal heterochromatin. The cytoplasm, which appears basophilic by LM, is filled with a high number of well-organized ER cisternae– a striking ultrastructural feature of these cells seen by TEM.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Antibody production - Regulation of inflammatory responses - Immunomodulation 	<p>(10) (11) (12)</p>
<p>Eosinophils</p>  	<p>Cells with a segmented (polylobed) nucleus with condensed marginal chromatin and cytoplasm packed with a single population of secretory granules (specific granules), which appear as highly acidophilic structures by LM and with a unique morphology by TEM: bicompartamental organelles with a central electron-dense core surrounded by an electron-lucent matrix.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Destruction of parasite egg through the secretion of cationic proteins - Immunomodulation - Polarization of Th2 immune responses - ECM remodelling - Clearance of debris 	<p>(13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21)</p>

(Continues)

Table 1. (Cont.)


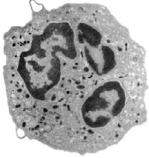
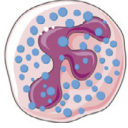
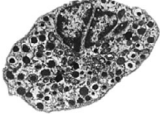
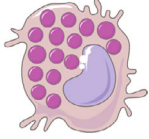
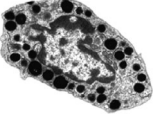

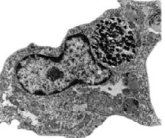
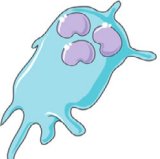
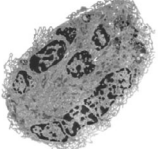

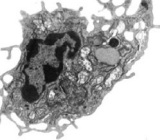
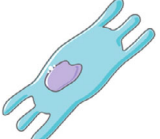

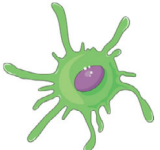
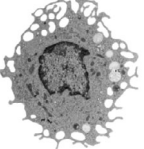
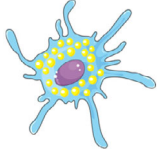
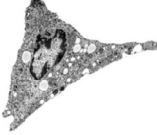


Cell populations	Morphological features	Possible roles*	Refs
<p>Neutrophils</p>  	<p>Cells showing a segmented (polylobed) nucleus with a condensed marginal chromatin and a cytoplasm filled with different granule populations: (i) azurophilic (primary); (ii) specific (secondary); and (iii) gelatinase (tertiary).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Destruction of the parasite egg shell (22) - Antihelminth action (23) - ECM remodelling (24) 	
<p>Basophils</p>  	<p>Cells with a segmented (polylobed) nucleus with condensed marginal chromatin and a cytoplasm filled with large secretory granules seen as basophilic/metachromatic structures by LM and electron-dense organelles by TEM.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Promotion of granuloma formation (25) - Antihelminth action (26) (27) (28) (29) (30) (31) 	
<p>Mast cells</p>  	<p>Cells with a monolobed (non-segmented) nucleus and a cytoplasm rich in secretory granules, which appear metachromatic by LM and with variable electron-density and morphology (different substructural patterns) by TEM.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Induction and maintenance of fibrosis (32) - Activation of hepatic stellate cells (33) (34) (35) 	
<p>Macrophages</p>  	<p>Cells showing many surface ruffings and pseudopodia, a single, non-segmented nucleus and an expanded cytoplasm rich in organelles, such as mitochondria, endoplasmic reticulum and Golgi complex, as well as vesicles and phagocytic vacuoles with variable sizes and morphologies, as observed by TEM.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Presentation of parasite-derived antigens to T cells (21) (36) - Regulation of initiation, maintenance, and resolution of granulomatous inflammation (37) (38) - Regulation of fibrosis development 	

Table 1. (Cont.)

Cell populations	Morphological features	Possible roles*	Refs
<p>Giant cells</p>  	<p>Cells characterized by the presence of multiple nuclei and extensive cytoplasm.</p> <p>Giant cells are formed by fusion of activated macrophages or epithelioid macrophages.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Phagocytosis of parasite egg components - Phagocytosis of other cell populations - Immunomodulation 	<p>(39)</p> <p>(40)</p> <p>(41)</p> <p>(42)</p>
<p>Kupffer cells</p>  	<p>Resident liver macrophages. Cells with a round nucleus and surface extensions residing within the lumen of the liver sinusoids, attached to the endothelial cells.</p> <p>The presence of phagocytic vacuoles with varying sizes and heterogeneous content, vesicles, lysosomes and prominent ER in the cytoplasm is observed by TEM.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Presentation of parasite antigens to T cells - Recruitment and differentiation of dendritic cells - Recruitment of neutrophils - Immunoregulation 	<p>(43)</p> <p>(44)</p> <p>(45)</p>
<p>Epithelioid macrophages</p>  	<p>Elongated cell with an elongated nucleus, interdigitated plasma membrane and abundant cytoplasm with a prominent Golgi complex and ER. Considered to be activated macrophages resembling epithelial cells.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Formation of a physical barrier, walling off the egg from the parenchymal cells - Immunomodulation through the secretion of chemokines/cytokines 	<p>(39)</p> <p>(46)</p> <p>(47)</p> <p>(48)</p>
<p>Dendritic cells</p>  	<p>Cells with numerous filopodia extending from their surface, a round nucleus and small cytoplasmic granules.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Presentation of parasite-derived antigens to T cells - Regulation of other cell populations - Regulation of fibrosis 	<p>(1)</p> <p>(49)</p> <p>(50)</p> <p>(51)</p> <p>(52)</p>

(Continues)

Table 1. (Cont.)

Cell populations	Morphological features	Possible roles*	Refs
Hepatic stellate cells  	Resident cells located in the space of Disse of the liver sinusoid. They have a characteristic morphology with a round nucleus, many cytoplasmic processes, and lipid bodies in the cytoplasm.	- Production of ECM components (main source of collagen deposition) - ECM remodelling	(53) (54) (55) (56) (57)
Fibroblasts  	Resident elongated cells with typical ultrastructure: a large predominantly euchromatic nucleus and cytoplasm rich in rough ER cisternae.	- Synthesis of ECM components (collagen and elastic fibres) - Formation of fibre radiation centres - Recruitment of eosinophils and other leukocytes	(58) (59) (60) (61)

LM, light microscopy; TEM, transmission electron microscopy; ER, endoplasmic reticulum; ECM, extracellular matrix.

References: (1) Zheng *et al.* (2020); (2) Sher & Coffman (1992); (3) Rumbley *et al.* (1998); (4) Sombetzki *et al.* (2015); (5) Prendergast *et al.* (2016); (6) Ferru *et al.* (1998); (7) El-Cheikhi *et al.* (1998); (8) Fallon & Dunne (1999); (9) Ndlovu *et al.* (2018); (10) von Lichtenberg *et al.* (1973); (11) Fairfax *et al.* (2012); (12) Fairfax *et al.* (2013); (13) Amaral *et al.* (2017); (14) Lenzi *et al.* (1987); (15) Swartz *et al.* (2006); (16) Dias *et al.* (2018); (17) James & Colley (1976); (18) Khalife *et al.* (1989); (19) Butterworth *et al.* (1979); (20) Rumbley *et al.* (1999); (21) Ariyaratne & Finney (2019); (22) Anwar *et al.* (1980); (23) De Broski *et al.* (2008); (24) Morais *et al.* (2018); (25) Anyan *et al.* (2013); (26) Falcone *et al.* (1996); (27) Falcone *et al.* (2001); (28) Schramm *et al.* (2003); (29) Schramm *et al.* (2007); (30) Schwartz *et al.* (2014); (31) Eberle & Voehringer (2016); (32) Miller *et al.* (1994); (33) Newlands *et al.* (1995); (34) Khalil *et al.* (1996); (35) Costa-Silva *et al.* (2002); (36) Barron & Wynn (2011); (37) Schook *et al.* (1983); (38) Lukacs *et al.* (1993); (39) Pagan & Ramakrishnan (2018); (40) Chensue *et al.* (1992); (41) El-Ahwany *et al.* (2000); (42) Farah *et al.* (2000); (43) Anthony *et al.* (2012); (44) Hayashi *et al.* (1999); (45) Naito *et al.* (2004); (46) Hsü *et al.* (1972b); (47) Mathew & Boros (1986); (48) Mariano (1995); (49) van der Kleij *et al.* (2002); (50) van Liempt *et al.* (2007); (51) Everts *et al.* (2016); (52) Lundie *et al.* (2016); (53) Brito & Borojevic (1997); (54) Anthony *et al.* (2010); (55) Paiva *et al.* (2010); (56) Anthony *et al.* (2013); (57) Carson *et al.* (2018); (58) Lenzi *et al.* (1999); (59) Wyler *et al.* (1981); (60) Lukacs *et al.* (1994); (61) Gieseck *et al.* (2016).

*The roles of cell populations in the granuloma are not well established, and remain unrecognized, unclear, speculative or controversial.

populations are not homogeneously distributed within these regions but have a preferential localization within the granuloma (see Section III) (Lenzi *et al.*, 1999, 2006).

We suggest that the spatial, organizational, and functional attributes of the hepatic schistosomal granuloma can be viewed as an ecosystem.

III. INTEGRATED CELL POPULATIONS INHABITING GRANULOMAS

Cell populations within a hepatic *Schistosoma* granuloma show distinct morphological features and can play different roles in the maintenance/functioning of this structure (Table 1). The

existence of these varied cell populations shapes a specialized cell community that demands the coexistence of cells with similar life habits and resource needs and in prominent interactions with the external medium (ECM components). This creates a system comparable by definition to an ecosystem (see Table 2 for glossary) (Odum & Barret, 2005).

Granulomas generally are not composed of cell types at equal abundances, which is similar to species in a community (Table 2) where there are a few abundant 'common' species and many less-abundant 'rare' species that can be described using a log-normal abundance distribution curve (Krebs, 1989). In this sense, the 'community' of immune cells within a hepatic mature granuloma contains mostly eosinophils (60–70% of the cells present) (Moore, Grove & Warren, 1977; Amaral *et al.*, 2017), neutrophils (less than

10%) (Moore *et al.*, 1977) and macrophages (~30%) (reviewed in Chuah *et al.*, 2014). Other populations of inflammatory cell types (Table 1) such as basophils are less abundant in the granuloma (Schramm *et al.*, 2003). However, the occurrence and frequency of different inflammatory cell populations changes with the progress of hepatic schistosomal granulomas (Fig. 1B). For example, the cell density of eosinophils decreases gradually (Lenzi, Sobral & Lenzi, 1987). These changes in cellular abundance and composition can be compared to terrestrial vegetation stages undergoing ecological succession (Fig. 1C).

Populations of cells in hepatic schistosomal granulomas (Table 1) communicate with each other by secreting a complex interacting network of immune mediators and other molecules such as cytokines, chemokines, and growth factors (Kubota, Avarbock & Brinster, 2004; Barron & Wynn, 2011; Chuah *et al.*, 2014; Pagán & Ramakrishnan, 2018). For example, T lymphocytes release tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which attracts macrophages towards the granuloma (Pagán & Ramakrishnan, 2018). In turn, macrophages produce matrix metalloproteinase 9 (MMP9), which is also released by neutrophils, with roles in the matrix remodelling

Table 2. List of ecological terms and definitions in classical ecology and as applied to the granuloma

Terms	Definition in classical ecology	Definition in granuloma context
Community	A group of interacting populations that integrates in the same area at the same time. This group is capable of modifying the environment through interactions with each other and non-living factors.(1),(2)	Group of cell populations that interact with each other and with the extracellular matrix. This group is able to respond to and to modify the granuloma microenvironment.
Ecological niche	Total sum of environmental requirements for the survival of an organism. It includes not only the physical space (spatial niche or habitat) occupied by an organism, but also its functional role in the community and its position in the environmental gradients.(3),(4),(5),(6)	Total sum of multifunctional activities played by cell populations to survive in the granuloma (ecological niche), such as production/secretion of molecules and interactions with other cells and the extracellular matrix.
Ecological retrogressive succession	The succession process by which, after a time in the developmental process, a community becomes less diverse, mostly by reduction of both its structural complexity (biomass) and species composition.(7),(8),(9),(10)	Final stages of granuloma progression (i.e. resolution phase), which are marked by a decrease in the structural complexity of the granuloma (biomass) with reduction of both cell community density and composition of the extracellular matrix.
Ecological succession	The evolutionary process undergone by a community during the construction and development of an ecosystem, encompassing changes in energy distribution, species composition, and population interactions over time.(11),(12),(13),(14),(15),(16)	The evolutionary process undergone by the cell community during the formation and development of the granuloma, encompassing changes in the composition/distribution of cell populations and elements of the extracellular matrix, and population interactions over time.
Ecosystem	Any functionally open system unit (with inputs, outputs and boundaries) comprising all living organisms in a given area interacting with each other and with the physical environment (non-living components). This can be either natural or arbitrary and includes energy flow and cycling of matter within the system.(17),(18),(19),(20)	An interactive system of cells (biotic component), protein scaffolds, fibres and biochemicals (abiotic components) with inputs/outputs of matter and energy, which present dynamism; reconstruction; homeostasis and self-organization.
Habitat (spatial niche)	The place where a particular organism lives or can be found.(11),(17),(21),(22),(23),(24)	The place where different cell populations inhabit or can be found.
Pioneer species	First species to colonize a given area, for instance, a previously disrupted or damaged ecosystem, beginning a chain of ecological succession.(11),(25)	First cell populations to colonize a damaged host tissue (granuloma site/ecosystem). Macrophages and lymphocytes are the pioneer cells which are followed by other cell populations ('ecological succession').
Population	Any group of organisms that belong to the same species occupying a particular space and functioning as part of a community.(17),(26),(27)	Any group of cells with the same phenotype occupying a particular space within the granuloma and functioning as part of the granuloma community.
Secondary ecological succession	The succession process that generally occurs after a disturbance on a site previously occupied. This process takes place by recolonization of the environment by other populations (i.e. species replacement).(25),(28),(29)	Granuloma formation occurs by a process of recolonization of the host tissue by incoming inflammatory infiltrating cells, in response to a local stress induced by parasite eggs lodged in the host tissue that secrete toxins and kill parenchymal cells.

References: (1) Begon & Townsend (2020); (2) Diamond & Case (1986); (3) Gray & Lowery (1996); (4) Chase & Leibold (2003); (5) Hutchinson (1957); (6) Leibold (1995); (7) Iversen (1964); (8) Walker & Reddell (2007); (9) Gaxiola *et al.* (2010); (10) Peltzer *et al.* (2010); (11) Clements (1916); (12) Odum & Pinkerton (1955); (13) Margalef (1958); (14) Drury & Nisbet (1973); (15) Luken (1990); (16) McIntosh (1981); (18) Evans (1956); (19) Ulanowicz (1972); (20) Patten & Odum (1981); (21) Southwood (1977); (22) Whittaker *et al.* (1973); (23) Kroes (1977); (24) Ricklefs & Cox (1978); (25) Horn (1974); (26) Park (1934); (27) MacArthur (1958); (28) Vitousek *et al.* (1989); (29) Peet & Christensen (1980).

and in induction of apoptosis of HSCs (Zhou *et al.*, 2004; Wynn & Barron, 2010). HSCs modulate granuloma fibrosis through different mechanisms (Carson *et al.*, 2018), and also produce stem cell factor (SCF), which is fundamental for mast cell maturation and activation. Secretion of SCF can be stimulated by TNF- α released by mast cells (Brito & Borojevic, 1997). B-lymphocytes are thought to regulate granuloma formation, reducing its exacerbation, in part by B-cell secretion of interleukin 12 (IL-12), which, in turn, regulates the actions of T-lymphocytes (Wynn & Cheever, 1995; Jankovic *et al.*, 1998).

A plethora of intra- and interspecific cell relationships takes place within the granuloma, but the extent to which each cell population acts within this dynamic structure remains to be established. One problem regarding understanding the roles of inflammatory cells in the granuloma is that different cell populations work in an integrated way (as in an ecosystem), while investigations tend to be focused on a specific cell population, which does not reflect the whole system.

Another important indication that cells within the granuloma constitute an integrated cell community (Table 2), which interacts with the medium, is the fact that the presence or absence of one cell population (i.e. unique cell type) may affect the entire cell community with consequences on the overall 'service' provided by the 'ecosystem' (Wootton & Emmerson, 2005). For example, B cell-knockout mice show exacerbated granulomatous inflammation (Jankovic *et al.*, 1998), which might implicate this cell type in population control within the granuloma. By contrast, the depletion of basophils reduces granuloma formation and size (Anyan *et al.*, 2013).

Early studies with athymic mice established the essential role of T cells in granuloma development (Hsü *et al.*, 1976; Phillips *et al.*, 1977). In fact, schistosome egg-induced immunopathology is believed to rely on functions of the T lymphocyte population, especially CD4+ T cells (Chuah *et al.*, 2014). However, although these cells are considered central for immune responses against the parasite, a recent review addressing the role of subsets of CD4+ T cells in the hepatic *Schistosoma* granuloma considered it a daunting challenge to achieve a clear understanding of how these cells regulate the pathological process (Zheng *et al.*, 2020). Even less clear are the functions of other lymphocyte subpopulations, including CD8+ T cells and gamma delta T cells as well as eosinophils (Yap *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 2004; Swartz *et al.*, 2006). Although eosinophils constitute a major population within the granuloma, it remains unclear if they act as effector cells against the parasite, as immunomodulators of the immune response, as participants in tissue homeostasis and metabolism, or merely as operators in remodelling and the clearance of debris (Meeusen & Balic, 2000; Swartz *et al.*, 2006; Cadman & Lawrence, 2010; Huang & Appleton, 2016; Tweyongyere *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2018). Reasons for the dominance of the eosinophil population within the hepatic schistosomal granuloma, speculated previously to be due to selective apoptosis of lymphocytes (Rumbley *et al.*, 2001), remain enigmatic.

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, Deelder & Van Marck, 1999; Lenzi *et al.*, 2006; Figliuolo da Paz, Figueiredo-Vanzan & dos Santos Pyrrho, 2019). The spatial distribution of these molecules within hepatic schistosomal granulomas enables a concentric organization of cell populations according to a thermodynamic model of cellular interaction (Lenzi *et al.*, 2006). This model predicts that mixed cells interact to form an assemblage with the lowest interferential free energy (i.e. a 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 sort themselves randomly but flow actively to generate distinct and well-defined layers. 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 (Lenzi *et al.*, 2006, 2008).

What emerges from this discussion is that granuloma functionality depends on the whole community of cells, with distinct cell populations participating in different ways, analogous to an ecosystem in which species interact both with each other and with the environment.

IV. COLONIZATION BY THE CELL COMMUNITY DURING GRANULOMA FORMATION: AN ECOLOGICAL SUCCESSION

A central question in understanding *Schistosoma mansoni* infections is: how does the community of cells colonize the hepatic tissue to form a granuloma? This might be explained from the viewpoint of an 'ecological succession' (Table 2; Fig. 1), whereby a community modifies its physical environment (Odum & Pinkerton, 1955; Margalef, 1958; Drury & Nisbet, 1973; McIntosh, 1981; Luken, 1990), creating conditions and resources for a 'secondary succession' at a location previously occupied by another community (Odum, 1966; Horn, 1974; Peet & Christensen, 1980; Vitousek, Matson & Van Cleve, 1989).

The primary hepatic tissue community is composed of parenchymal cells (hepatocytes) and resident non-parenchymal cells (liver sinusoidal endothelial cells, portal fibroblasts, HSCs and Kupffer cells) (Table 1) (Anthony, Ramm & McManus, 2012). After the deposition of a parasite egg in the liver, hepatocytes start to die due to toxic products released by the eggs [soluble egg antigens (SEAs)]. SEAs are chemoattractants for infiltrating macrophages and lymphocytes which then focally replace the dying hepatocytes (Lenzi *et al.*, 2008; Lins *et al.*, 2008). Thus, a process akin to secondary succession in areas of deforested or burned forests or in abandoned crop fields (Lemon, 1949; Odum, 1966; Bazzaz & Pickett, 1980) takes place.

During forest formation, pioneer species (Table 2) are the first to colonize the environment. They have high growth rates and small size, such as mosses and grasses (Clements, 1916; Horn, 1974) (Fig. 1C). Macrophages and lymphocytes (Table 1) could be considered as pioneer cell populations since they are the first ‘cell species’ to colonize the granuloma site. These cells play an important role in the recruitment of other inflammatory populations including additional T cells, B cells, plasma cells, eosinophils, mast cells, neutrophils, basophils, and other macrophages (Table 1) (Phillips *et al.*, 1977; Rossi *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2001; Pagán & Ramakrishnan, 2018).

Granuloma construction occurs under dynamic and intricate cell–cell and cell–matrix interactions involving the release of diverse cytokines, chemokines, growth factors, and ECM compounds (Bentley, Doughty & Phillips, 1982; Borojevic, 1992; Lenzi *et al.*, 1998, 2006). As in succession processes 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, many variables change in the granuloma ‘ecosystem’: numbers and types of cells; constituents and arrangement of the ECM, including types of collagen fibres (from type I to type III) and glycosaminoglycan content; and diffusion rates of secreted molecules (el-Meneza *et al.*, 1989; Lenzi *et al.*, 2006, 2008). For example, the earliest hepatic granulomas form in a T helper cell 1 (Th1)-dominated 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 to changes in the community composition during the phases of evolution of the hepatic granuloma. Therefore, the environment alterations enable modulation of responses of different populations in the granuloma context. For example, the lymphocyte population regulates production of specific cytokines that trigger suppressor activities *via* histamine receptors, likely produced by mast cells (Weinstock & Blum, 1987). The population of mast cells inside hepatic granulomas in mice shows a cyclic behaviour, first emerging at 40 days of infection and subsequently reaching high proportions at 80 and 160 days post infection (Lenzi *et al.*, 1987, 1998).

The early phase of the *Schistosoma* granuloma is marked by recruitment and activation of cells such as fibroblasts, myofibroblasts, and HSCs, leading to the production of ECM and collagen fibres that form a layer at the outer zone of the granuloma. The ECM is dynamically produced, degraded and reabsorbed. The granuloma develops a variable and irregular collagenic topology, originating from bidirectional centrifugal and centripetal assemblages of units of collagen growth, forming a fractal pattern (Lenzi *et al.*, 2006). During the EP stage of granulomas (Fig. 1A), the self-assembly of these fibres minimizes energy and mass through continuous tension and focal compression (Lenzi *et al.*, 1999). The 3D architecture of granulomas thus provides increased tissue integrity, efficient distribution of soluble compounds, and a competent background for directional cell movement (haptotaxis) (Lenzi *et al.*, 1999, 2006).

During its final stages, the granuloma becomes significantly reduced in size and in cell community composition (Fig. 1A, B), events associated with a decline in the inflammatory response (Lenzi *et al.*, 1998; Burke *et al.*, 2009). The egg also reduces in size, and its shell becomes surrounded by collagen fibres. Eventually, the egg disintegrates, with formation of residual pigmented scars (Andrade & Grimaud, 1988; Lenzi *et al.*, 1991). From an ecological point of view, this resolution phase can be seen as parallel to the succession of plant communities, in which the initial stages are characterized by progressive accumulation of species richness and plant biomass followed by a retrogressive phase, represented by a decrease in species abundance and richness (Fig. 1C). Retrogression in plant ecosystems is related to a lack of sufficient essential resources (Iversen, 1964; Walker & Reddell, 2007; Gaxiola *et al.*, 2010; Peltzer *et al.*, 2010; Walker & Wardle, 2014), and this may also apply to late-stage granulomas (Fig. 1).

The formation/evolution of the hepatic schistosomal granuloma is a non-linear dynamic phenomenon (Lenzi *et al.*, 2006) that can be studied using mathematical modelling (Lenzi, Romanha & Pelago-Machado, 2004) as has been done for granulomas induced by other pathogens (Hao, Crouser & Friedman, 2014; Siewe *et al.*, 2017; Magombedze & Marino, 2018). The *Schistosoma* granuloma evolves from an initial disordered phase (pre-granulomatous stage) to a highly organized cellular assembly (granulomatous stage) (Fig. 1A). In this perspective, the granuloma has two sequential phases: a necentropic (which denies entropy) phase of evolution and creation, followed by an entropic phase of decay and dissolution, events that can be seen as parallel to a succession climax as classically discussed for ecosystems (Table 2) (Clements, 1916; Whittaker, 1953).

V. GRANULOMA AND ECOLOGICAL NICHE

‘Niche’ is a term adopted from Ecology by the fields of Cell Biology and Pathology (Table 2). It describes a specialized microenvironment in which cells can reside, grow and differentiate (Morrison & Spradling, 2008; Pienta *et al.*, 2008; Kareva, 2015). The first application of the niche concept to a cellular system was for haematopoietic stem cells (Schofield, 1978): a defined and limited anatomical site where stem cells could exist, reproduce and possibly alter their phenotype (reviewed by Papayannopoulou & Scadden, 2008). Subsequently, ‘niche’ has been widely used to refer to local tissue microenvironments that maintain and regulate all types of stem cells (Lin, 2002; Morrison & Spradling, 2008; MacLean, Filippi & Stumpf, 2014; Prager *et al.*, 2019).

Granulomas formed in response to different pathogens have also been referred to as ‘niches’, or ‘pathological niches’, to refer to these structures as compartmentalized regions (Fig. 2) where ongoing immune responses involving cytokine release and cell activation take place and not

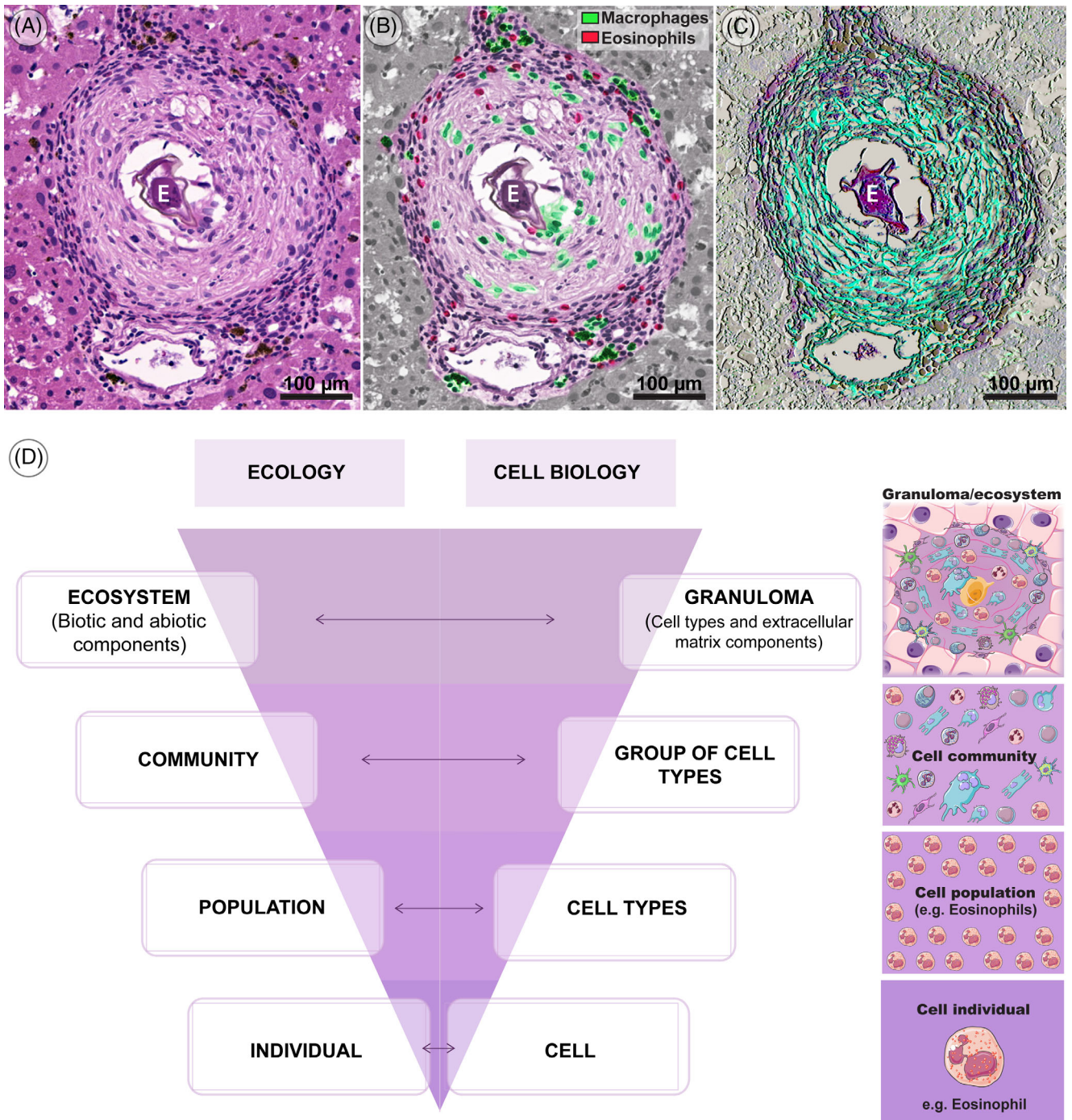


Fig 2. Levels of organization within a hepatic *Schistosoma* granuloma. (A–C) Light micrographs of a representative mature granuloma showing its highly organized and complex structure. Note that the granuloma is spatially well demarcated from the surrounding hepatic tissue (seen in grey in B). Within the granuloma/spatial niche, different cell populations such as macrophages and eosinophils (highlighted in B), reside in specific topographic areas. In the mature granuloma, the macrophage population migrates centripetally to the periovular region while eosinophils are found in the peripheral and paracentric layers of the granuloma (Lenzi *et al.*, 2006, 2008), which contains extensive arrangements of extracellular matrix fibres (abiotic component), mainly collagen fibres (stained green in C) around the parasite egg (labelled E). Liver sections were stained with hematoxylin–eosin (A, B) or Gomori’s trichrome (C). Sections are from the same granuloma. In C, the surrounding tissue was digitally faded to highlight the granuloma boundaries and fibres. (D) Comparison of levels of cellular organization in the granuloma with the hierarchical structure of biological systems.

merely locations where inflammatory cells are concentrated (Yoneyama & Ichida, 2005; Ehlers & Schaible, 2013; Martin, Carey & Fortune, 2016). However, granulomas, from an ecological perspective are much more complex than compartments defined as ‘pathological niches’.

The ecological niche (Table 2) is a central conceptual tool for capturing the intricate interactions between an organism and its environment. Ecological niche perspectives are multi-dimensional attributes required for an individual or population to survive, as well as defining the interactions that species can establish at the community level (Gray & Lowery, 1996; Chase & Leibold, 2003; Odum & Barret, 2005).

Within the granuloma, we argue that one type of inflammatory cell constitutes a cell population, and that groups of cell populations comprise a cellular community (Fig. 2D), which is tightly organized in a fibrous matrix (Fig. 2C), actively produced by other equally important cell populations (resident cells). As detailed in Table 1, different cell populations inhabit the hepatic schistosomal granuloma with diverse functional capabilities and the links among these cell populations can be compared to an ecological network. Yet, spatially, as for species in an ecological niche, the cell populations within the granuloma lodge in specific positions within the granuloma boundaries, structurally walling off the granuloma from the rest of the host tissue (Fig. 2A–C) (Lenzi *et al.*, 2006). The presence in hepatic schistosomal granulomas of molecules involved in cell–cell adhesion and cell–cell communication, such as cadherins and connexins respectively, in addition to *in situ* production and release of immune mediators supports the idea that cell populations within the granuloma are involved in complex interactions.

From an ‘ecological niche’ perspective (Table 2), the granuloma can be seen not only as the place where a community of cells is settled (spatial niche or habitat) but also as a site in which the functional activities of the combined populations, involving multi-directional interactions among them and/or with the ECM, occur in an orchestrated way in response to microenvironmental gradients (e.g. cytokines and SEAs). The hepatic granuloma contains not only resident and inflammatory, fully differentiated cells but also pluripotent haematopoietic precursors which, directed by local haematopoietic growth factors and their cognate receptors from the granuloma microenvironment, are able to undergo differentiation and maturation (Dutra *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 1999). The hepatic schistosomal granuloma has been shown to function as an active extramedullary haematopoietic site, producing potentially all myeloid lineages (Dutra *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 1999; Lenzi *et al.*, 2006). Moreover, SEAs influence the functional activity of local cell populations. For example, omega-1, a glycosylated ribonuclease abundantly present in SEAs, programs dendritic cells to drive Th2 polarization (Everts *et al.*, 2009; Steinfeldt *et al.*, 2009) through a refined mechanism (Everts *et al.*, 2012). The granuloma microenvironment thus impacts the decision of a cell population to differentiate, proliferate, secrete a specific product, activate or even to die and, acting as ‘species’ within their specific ‘niche’, all cell populations are both affected by

and able to change this microenvironment, acting together to achieve eradication of the infection.

We argue that to comprehend the fundamental nature of the *Schistosoma* granuloma, it is important to understand the environmental factors that govern the establishment, interactions, and survival of the cell populations within this ecological niche, how this niche is constructed, and how its inner workings favour the host or the parasite.

VI. THE *SCHISTOSOMA* GRANULOMA: A REAL ECOSYSTEM?

An ecosystem is a biological organization that includes flows of energy and matter and interactions between biotic (living) and abiotic (non-living) components (Evans, 1956; Ulanowicz, 1972; Patten & Odum, 1981; Odum & Barret, 2005). The schistosomal granuloma has many parallels with ecosystems (Table 2). Dominant ecological paradigms that guide this new view include: (i) flows of energy; and (ii) cycling of matter (Odum, 1966; Patten & Odum, 1981; Morowitz & 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, fibres, and chemical compounds (abiotic components) with inputs/outputs of energy and matter. In this respect they are as complex as classical ecosystems such as forests.

Ecological concepts are fundamentally multidimensional in nature (Alley, 1982; Jordán & Scheuring, 2004). The numerous elements (cells, signalling molecules, and matrix components) that interact to build a granuloma mean that its global behaviour can only be understood as an emerging consequence of the integral sum of all cooperative phenomena (Lenzi *et al.*, 2004, 2006). Hepatic granulomas studied in infected models can reach a population of more than 40000 cells (including both migrated and resident cells) working in an integrated way upon a platform of a highly structured ECM, and orchestrated by a plethora of internally secreted products (Lenzi *et al.*, 2006). The granuloma is consistently modulated and regulated by internal conditions (Lenzi *et al.*, 2006). The schistosomal granuloma thus satisfies the characteristics of a complex system, such as dynamism, reconstruction, homeostasis, and self-organization. The same parameters are frequently applied to ecosystems in nature (Kay, 1991; Brulisauer, Bradfield & Maze, 1996; Levin, 1998; Wagendorp *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012; Miller, Mote & Ranseyer, 2019) and, likewise, granulomas work as spatial units determined by a 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 *et al.*, 2006).

Although the hepatic granuloma is generally an avascular structure (occasionally with blood vessels in its periphery), there are flows and cycling of cells and other elements within its boundaries. It is not a tangled web of individual cells and fibres, but an organized structure, in which the 3D

arrangement of its fibres originating from fibre radiation centres provides increased tissue integrity and efficient distribution of soluble compounds (growth factors and cytokines) enabling cells to perform their functions and to move (Lenzi *et al.*, 1999, 2006). The large number of signalling molecules that diffuse within the granuloma matrix result in a flow of information among cell populations, and can be seen as real networks or circuits (Patten & Odum, 1981; Lenzi *et al.*, 1991; Wynn & Cheever, 1995; Brunet *et al.*, 1999). These molecules also include egg products, which lead to the recruitment of immune cells (Boros & Warren, 1970; Lundy, Lerman & Boros, 2001; Schwartz & Fallon, 2018).

We believe that both the environmental structure of the granuloma, and its dynamic events of input (migration and local proliferation) and output (apoptosis, necrosis) of cells, make the granuloma an integrative site for cell populations with inputs and outputs of matter and energy – characteristics of an ecosystem. Thus, the levels of organization of cellular components in the schistosomiasis granuloma defined by cell biologists can fit perfectly into the hierarchical structure of biological systems defined by ecologists (Fig. 2D).

VII. CONCLUSIONS

- (1) Ecological perspectives are not limited just to one spatial scale, but may also be applied to cells and to genes. Interconnected views between Ecology and Cell Biology (Cellular Ecology) are increasingly popular in attempts to understand cell behaviour, responses and interactions (Gatenby, 1991; Wassom, 1993; Papayanopoulou & Scadden, 2008; Amend *et al.*, 2016; Steidl, 2017). In cancer biology, for example, the microenvironment has been considered a significant factor that participates in the control of the biological properties of tumours (Sutherland, 1988; Aritzia *et al.*, 2006; Lu, Weaver & Werb, 2012; Prager *et al.*, 2019). By exploring hepatic *Schistosoma* granulomas using the perspectives of both Ecology and Cell Biology, we here provide new conceptual insight of granulomas as functioning ecosystems.
- (2) We defined the schistosomal granuloma from an ecological perspective. It is an interactive ecosystem, formed by cells (biotic component), protein scaffolds, fibres, and chemical compounds (abiotic components) with inputs/outputs of energy and matter. We detailed the diversity of cell populations ('species') living within the granuloma and explored how they interact with each other and with the microenvironment to form a multifaceted cell community in different space–time frames.
- (3) We identified the granuloma as a dynamic evolutionary system that undergoes progressive changes in the 'species' that compose its community over time. Colonization of hepatic tissue to form granulomas is explained from the viewpoint of an ecological succession whereby a community is able to modify its

physical environment, creating the conditions and resources for ecosystem construction.

- (4) We reflected on the fundamental nature of the *Schistosoma* granuloma and how it is important to understand the environmental factors that govern the establishment, interactions, and survival of the cell populations within this ecological niche. In line with ecological concepts, we examine the granuloma not only as a place where a community of cells is settled (spatial niche or habitat) but also as a site in which the functional activities of these combined populations occur in an orchestrated way in response to microenvironmental gradients such as cytokines and SEAs.
- (5) Despite major advances in understanding the *Schistosoma* granuloma, much remains unclear regarding this intriguing structure. What may emerge from changing our current understanding of the schistosomal granuloma from a histopathological viewpoint to an active ecosystem perspective is that attention will be directed to cell events/behaviours that may be central to comprehending the disease biology. Cells within a granuloma establish interactions with each other and with the granuloma microenvironment. As for species in a classical ecosystem, these cell populations must be considered as a community and not just from an individual perspective. Future evaluations of granulomas in schistosomiasis from an ecological perspective may be crucial to understanding the complex relationships among the parasite, pathophysiology of infection and host immunity. For example, the intestinal granuloma, which has a particular role in chaperoning parasite eggs to the organ lumen resulting ultimately in disease transmission (Costain, MacDonald & Smits, 2018; Schwartz & Fallon, 2018), may be understood best in the light of Cellular Ecology – how does the gut microenvironment/microbiota influence granuloma formation and dynamics? In this context, new experimental toolsets and predictive models applying ecological approaches for populational, community and ecosystem dynamics will pave the way for a better understanding of this disease, eventually enabling its treatment and control.

VIII. ACKNOWLEDGEMENTS AND AUTHOR CONTRIBUTIONS

This paper is dedicated to the memory of the Brazilian scientist Henrique Lenzi who advanced investigations into schistosomal granulomas and inspired us with his cutting-edge hypotheses and enthusiasm. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, grants 434914/2018-5 and 309734/2018-5 to R.C.N.M) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil). V.H.N. and C.P. are fellowship holders from FAPEMIG

and CNPq, respectively. K.K.M. is a fellowship holder from the Federal University of Juiz de Fora (Programa de Bolsas de Pós-graduação- PBPG). We apologize to investigators whose work has not been cited because of space constraints.

Author contributions: All authors made substantial, direct and intellectual contributions to this work, contributed to writing and editing, and approved the final version.

IX. REFERENCES

- ALLEY, T. R. (1982). Competition theory, evolution, and the concept of an ecological niche. *Acta Biotheoretica* **31**, 165–179.
- AMARAL, K. B., SILVA, T. P., DIAS, F. F., MALTA, K. K., ROSA, F. M., COSTA-NETO, S. F., GENTILE, R. & MELO, R. C. N. (2017). Histological assessment of granulomas in natural 586 and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. *PLoS One* **12**, e0184696.
- AMEND, S. R., ROY, S., BROWN, J. S. & PIENTA, K. J. (2016). Ecological paradigms to understand the dynamics of metastasis. *Cancer Letters* **380**, 237–242.
- ANDRADE, Z. A. (2009). Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunology* **31**, 656–663.
- ANDRADE, Z. A. & GRIMAUD, J. A. (1988). Morphology of chronic collagen resorption. A study on the late stages of schistosomal granuloma involution. *The American Journal of Pathology* **132**, 389–399.
- ANTHONY, B., MATHIESON, W., DE CASTRO-BORGES, W. & ALLEN, J. (2010). *Schistosoma mansoni*: egg-induced downregulation of hepatic stellate cell activation and fibrogenesis. *Experimental Parasitology* **124**, 409–420.
- ANTHONY, B. J., JAMES, K. R., GOBERT, G. N., RAMM, G. A. & McMANUS, D. P. (2013). Schistosoma eggs induce a proinflammatory, anti-fibrogenic phenotype in hepatic stellate cells. *PLoS One* **8**, e68479.
- ANTHONY, B. J., RAMM, G. A. & McMANUS, D. P. (2012). Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. *Trends in Parasitology* **28**, 572–579.
- ANWAR, A. R. E., MCKEAN, J. R., SMITHERS, S. R. & KAY, A. B. (1980). Human eosinophil-and neutrophil mediated killing of schistosome of *Schistosoma mansoni* in vitro. I. Enhancement of complement-dependent damage by mast cell-derived mediators and formyl methionyl peptides. *Journal of Immunology* **124**, 1122–1129.
- ANYAN, W. K., SEKI, T., KUMAGAI, T., OBATA-NINOMIYA, K., FURUSHIMA-SHIMOGAWARA, R., KWANSA-BENTUM, B., AKAO, N., BOSOMPEM, K. M., BOAKYE, D. A. & WILSON, M. D. (2013). Basophil depletion downregulates *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation. *Parasitology International* **62**, 508–513.
- ARIYARATNE, A. & FINNEY, C. A. M. (2019). Eosinophils and macrophages within the Th2-induced granuloma: balancing killing and healing in a tight space. *Infection and Immunity* **87**, e00127-00119.
- ARITZIA, E. V., LEE, C. J., GOGOI, R. & FISHMAN, D. A. (2006). The tumor microenvironment: key to early detection. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **43**, 2509–2514.
- BARRON, L. & WYNN, T. A. (2011). Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. *European Journal of Immunology* **41**, 2509–2514.
- BAZZAZ, F. A. & PICKETT, S. T. A. (1980). Physiological ecology of tropical succession: a comparative review. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**, 287–310.
- BEGON, M. & TOWNSEND, C. R. (2020). *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. John Wiley & Sons, Malden.
- BENTLEY, A. G., DOUGHTY, B. L. & PHILLIPS, S. M. (1982). Ultrastructural analysis of the cellular response to *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **31**, 1168–1180.
- BERRY, A., FILLAUX, J., MARTIN-BLONDEL, G., BOISSIER, J., IRIART, X., MARCHOU, B., MAGNAVAL, J. F. & DELOBEL, P. (2016). Evidence for a permanent presence of schistosomiasis in Corsica, France, 2015. *Euro Surveillance* **21**, 30100.
- BOROJEVIC, R. (1992). Experimental murine schistosomiasis mansoni: establishment of the chronic phase of the disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **8**, 171–174.
- BOROS, D. L. & WARREN, K. S. (1970). Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *Journal of Experimental Medicine* **132**, 488–507.
- BRITO, J. M. & BOROJEVIC, R. (1997). Liver granulomas in schistosomiasis: mast cell-dependent induction of SCF expression in hepatic stellate cells is mediated by TNF- α . *Journal of Leukocyte Biology* **62**, 389–396.
- BRULISAUER, A. R., BRADFIELD, G. E. & MAZE, J. (1996). Quantifying organizational change after fire in lodgepole pine forest understorey. *Canadian Journal of Botany* **74**, 1773–1782.
- BUNET, L. R., SABIN, E. A., CHEEVER, A. W., KOPF, M. A. & PEARCE, E. J. (1999). 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* **67**, 3014–3018.
- BUONOCORE, E., PICONE, F., DONNARUMMA, L., RUSSO, G. F. & FRANZESE, P. P. (2019). Modeling matter and energy flows in marine ecosystems using emergy and eco-emergy methods to account for natural capital value. *Ecological Modelling* **392**, 137–146.
- BURKE, M. L., JONES, M. K., GOBERT, G. N., LI, Y. S., ELLIS, M. K. & McMANUS, D. P. (2009). Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology* **31**, 163–176.
- BUTTERWORTH, A. E., WASSOM, D. L., GLEICH, G. J., LOEGERING, D. A. & DAVID, J. R. (1979). Damage to schistosome of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *The Journal of Immunology* **122**, 221–229.
- CADMAN, E. T. & LAWRENCE, R. A. (2010). Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? *Parasite Immunology* **32**, 1–19.
- CARSON, J. P., RAMM, G. A., ROBINSON, M. W., McMANUS, D. P. & GOBERT, G. N. (2018). Schistosome-induced fibrotic disease: the role of hepatic stellate cells. *Trends in Parasitology* **34**, 524–540.
- CHASE, J. M. & LEIBOLD, M. A. (2003). *Ecological Niches: Linking Classical and Contemporary Approaches*. University of Chicago Press, Chicago.
- CHEEVER, A. W., JANKOVIC, D., YAP, G. S., KULLBERG, M. C., SHER, A. & WYNN, T. A. (1998). 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* **93**, 25–32.
- CHENSU, S. W., TEREBUH, P. D., WARMINGTON, K. S., HERSHEY, S. D., EVANOFF, H. L., KUNKEL, S. L. & HIGASHI, G. I. (1992). Role of IL-4 and IFN- γ in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function. *The Journal of Immunology* **148**, 900–906.
- CHUAH, C., JONES, M. K., BURKE, M. L., McMANUS, D. P. & GOBERT, G. N. (2014). Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in Parasitology* **30**, 141–150.
- CLEMENTS, F. E. (1916). *Plant Succession: An Analysis of the Development of Vegetation*. Carnegie Institution of Washington, Washington, DC.
- COLLEY, D. G., ANDROS, T. S. & CAMPBELL, C. H. (2017). Schistosomiasis is more prevalent than previously thought: what does it mean for public health goals, policies, strategies, guidelines and intervention programs? *Infectious Diseases of Poverty* **6**, 1–8.
- COLLEY, D. G., BUSTINDUY, A. L., SECOR, W. E. & KING, C. H. (2014). Human schistosomiasis. *The Lancet* **383**, 2253–2264.
- COLLEY, D. G. & SECOR, W. E. (2007). A schistosomiasis research agenda. *PLoS Neglected Tropical Disease* **1**, e32.
- COSTA-SILVA, M., RODRIGUES-SILVA, R., HULSTIJN, M., NEVES, R. H., PANASCO, M. D. S., LENZI, H. L. & MACHADO-SILVA, J. R. (2002). Natural *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes*: histopathological and morphometric analysis in comparison to experimentally infected *N. squamipes* and C3H/He mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 129–142.
- COSTAIN, A. H., MACDONALD, A. S. & SMITS, H. H. (2018). Schistosome egg migration: mechanisms, pathogenesis and host immune responses. *Frontiers in Immunology* **9**, 3042.
- DE'BROSKI, R. H., OREKOV, T., PERKINS, C. & FINKELMAN, F. D. (2008). IL-10 and TGF- β redundantly protect against severe liver injury and mortality during acute schistosomiasis. *The Journal of Immunology* **181**, 7214–7220.
- DI BELLA, S., RICCARDI, N., GIACOBBE, D. R. & LUZZATI, R. (2018). History of schistosomiasis (bilharziasis) in humans: from Egyptian medical papyri to molecular biology on mummies. *Pathogens and Global Health* **112**, 268–273.
- DIAMOND, J. & CASE, T. J. (1986). *Community Ecology*. Harper & Row, New York.
- DIAS, F. F., AMARAL, K. B., MALTA, K. K., SILVA, T. P., RODRIGUES, G. S., ROSA, F. M., RODRIGUES, G. O. L., COSTA, V. V., CHIARINI-GARCIA, H., WELLER, P. F. & MELO, R. C. N. (2018). Identification of piecemeal degranulation and vesicular transport of MBP-1 in liver-infiltrating mouse eosinophils during acute experimental *Schistosoma mansoni* infection. *Frontiers in Immunology* **9**, 3019.
- DRURY, W. H. & NISBET, I. C. (1973). Succession. *Journal of the Arnold Arboretum* **54**, 331–368.
- DUTRA, H. S., ROSSI, M. I. D., AZEVEDO, S. P., EL-CHEIKH, M. C. & BOROJEVIC, R. (1997). Haematopoietic capacity of colony-forming cells mobilized in hepatic inflammatory reactions as compared to that of normal bone marrow cells. *Research in Immunology* **148**, 437–444.
- EBERLE, J. U. & VÖHRINGER, D. (2016). Role of basophils in protective immunity to parasitic infections. *Seminars in Immunopathology* **38**, 605–613.
- EHLERS, S. & SCHAIBLE, U. E. (2013). The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host–pathogen collusion. *Frontiers in Immunology* **3**, 411.

- EL-AHWANY, E. G., HANALLAH, S. B., ZADA, S., EL GHORAB, N. M., BADIR, B., BADAWY, A., SHARMY, H. I. & HASSANEIN, H. I. (2000). Immunolocalization of macrophage adhesion molecule-1 and macrophage inflammatory protein-1 in schistosomal soluble egg antigen-induced granulomatous hyporesponsiveness. *International Journal for Parasitology* **30**, 837–842.
- EL-CHEIKHI, M. C., BONOMO, A. C., ROSSI, M. I. D., MARIA DE FATIMA, B. P. & BOROJEVICI, R. (1993). Experimental murine schistosomiasis mansoni: modulation of the B-1 lymphocyte distribution and phenotype expression. *Immunobiology* **199**, 51–62.
- EL-MENEZA, S. E., OLDS, G. R., KRESINA, T. F. & MAHMOUD, A. A. (1989). Dynamics of hepatic connective tissue matrix constituents during murine *Schistosoma mansoni* infection. *Hepatology* **9**, 50–56.
- EVANS, F. C. (1956). Ecosystem as the basic unit in ecology. *Science* **123**, 1127–1128.
- EVERTS, B., HUSSAARTS, L., DRIESSEN, N. N., MEEVISSSEN, M. H., SCHRAMM, G., VAN DER HAM, A. J., VAN DER HOEVEN, B., SCHOLZEN, T., BURGENDORF, S., MOHRS, M., PEARCE, E. J., HOKKE, C. H., HAAS, H., SMITS, H. H. & YAZDANBAKHS, M. (2012). Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *Journal of Experimental Medicine* **209**, 1753–1767.
- EVERTS, B., PERONA-WRIGHT, G., SMITS, H. H., HOKKE, C. H., VAN DER HAM, A. J., FITZSIMMONS, C. M., DOENHOFF, M. J., VAN DER BOSCH, J., MOHRS, K., HAAS, H., MOHRS, M., YAZDANBAKHS, M. & SCHRAMM, G. (2009). Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 1673–1680.
- EVERTS, B., TUSSIWAND, R., DREESSEN, L., FAIRFAX, K. C., HUANG, S. C. C., SMITH, A. M., O'NEILL, C. M., LAM, W. Y., EDELSON, B. T., URBAN, J. F., MURPHY, M. M. & PEARCE, E. J. (2016). Migratory CD103+ dendritic cells suppress helminth-driven type 2 immunity through constitutive expression of IL-12. *Journal of Experimental Medicine* **213**, 35–51.
- FAIRFAX, K. C., AMIEL, E., KING, I. L., FREITAS, T. C., MOHRS, M. & PEARCE, E. J. (2012). IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. *PLoS Pathogens* **8**, e1002490.
- FAIRFAX, K. C., EVERTS, B., SMITH, A. M. & PEARCE, E. J. (2013). Regulation of the development of the hepatic B cell compartment during *Schistosoma mansoni* infection. *The Journal of Immunology* **191**, 4202–4210.
- FALCONE, F. H., DAHINDEN, C. A., GIBBS, B. F., NOLL, T., AMON, U., HEBESTREIT, H., ABRAHAMSEN, O., KLAUCKE, J., SCHLAACK, M. & HAAS, H. (1996). Human basophils release interleukin-4 after stimulation with *Schistosoma mansoni* egg antigen. *European Journal of Immunology* **26**, 1147–1155.
- FALCONE, F. H., PRITCHARD, D. I. & GIBBS, B. F. (2001). Do basophils play a role in immunity against parasites? *Trends in Parasitology* **17**, 126–129.
- FALLON, P. G. & DUNNE, D. W. (1999). Tolerization of mice to *Schistosoma mansoni* egg antigens causes elevated type 1 and diminished type 2 cytokine responses and increased mortality in acute infection. *The Journal of Immunology* **162**, 4122–4132.
- FARAH, I. O., NYINDO, M., KING, C. L. & HAU, J. (2000). Hepatic granulomatous response to *Schistosoma mansoni* eggs in BALB/c mice and olive baboons (*Papio cynocephalus anubis*). *Journal of Comparative Pathology* **123**, 7–14.
- FERRU, I., ROYE, O., DELACRE, M., AURIAULT, C. & WOLOWCZUK, I. (1998). Infection of B-cell-deficient mice by the parasite *Schistosoma mansoni*: demonstration of the participation of B cells in granuloma modulation. *Scandinavian Journal of Immunology* **48**, 233–240.
- FIGLIUOLO DA PAZ, V. R. F., FIGUEIREDO-VANZAN, D. & DOS SANTOS PYRRHO, A. (2019). Interaction and involvement of cellular adhesion molecules in the pathogenesis of *Schistosomiasis mansoni*. *Immunology Letters* **206**, 11–18.
- GATENBY, R. A. (1991). Population ecology issues in tumor growth. *Cancer Research* **51**, 2542–2547.
- GAXIOLA, A., MCNEILL, S. M. & COOMES, D. A. (2010). What drives retrogressive succession? Plant strategies to tolerate infertile and poorly drained soils. *Functional Ecology* **24**, 714–722.
- GIESECK, R. L. III, RAMALINGAM, T. R., HART, K. M., VANNELLA, K. M., CANTU, D. A., LU, W. Y., FERREIRA-GONZÁLEZ, S., FORBES, S. J., VALLIER, L. & WYNN, T. A. (2016). Interleukin-13 activates distinct cellular pathways leading to ductular reaction, steatosis, and fibrosis. *Immunity* **45**, 145–158.
- GRAY, V. & LOWERY, D. (1996). A niche theory of interest representation. *The Journal of Politics* **58**, 91–111.
- GRYSEELS, B., POLMAN, K., CLERINX, J. & KESTENS, L. (2006). Human schistosomiasis. *The Lancet* **368**, 1106–1118.
- HAMS, E., AVIELLO, G. & FALLON, P. G. (2013). The schistosoma granuloma: friend or foe? *Frontiers in Immunology* **4**, 89.
- HAO, W., CROUSER, E. D. & FRIEDMAN, A. (2014). Mathematical model of sarcoidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 16065–16070.
- HAYASHI, N., MATSUI, K., TSUTSUI, H., OSADA, Y., MOHAMED, R. T., NAKANO, H., KASHIWAMURA, S., HYODO, Y., TAKEDA, K., AKIRA, S., HADA, T., HIGASHINO, K., KOJIMA, S. & NAKANISHI, K. (1999). Kupffer cells from *Schistosoma mansoni*-infected mice participate in the prompt type 2 differentiation of hepatic T cells in response to worm antigens. *The Journal of Immunology* **163**, 6702–6711.
- HORN, H. S. (1974). The ecology of secondary succession. *Annual Review of Ecology and Systematics* **5**, 25–37.
- HOTEZ, P. J. (2017). The poverty-related neglected diseases: why basic research matters. *PLoS Biology* **15**, e2004186.
- HSÜ, C. K., HSÜ, S. H., WHITNEY, R. A. & HANSEN, C. T. (1976). Immunopathology of schistosomiasis in athymic mice. *Nature* **262**, 397–399.
- HSÜ, S. Y., HSÜ, H. F., DAVIS, J. R. & LUST, G. L. (1972a). 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* **66**, 89–97.
- HSÜ, S. Y., HSÜ, H. F., LUST, G. L. & DAVIS, J. R. (1972b). Organized epithelioid cell granulomata elicited by schistosome eggs in experimental animals. *Journal of the Reticuloendothelial Society* **12**, 418–435.
- HUANG, L. & APPLETON, J. A. (2016). Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes. *Trends in Parasitology* **32**, 798–807.
- HUTCHINSON, G. E. (1957). The multivariate niche. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **22**, 415–421.
- IVERSEN, J. (1964). Retrogressive vegetational succession in the post-glacial. *The Journal of Animal Ecology* **1**, 59–70.
- JACOBS, W., BOGERS, J., DEELDER, A. & VAN MARCK, E. (1997). Expression of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocytunction-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* **83**, 405–412.
- JACOBS, W., DEELDER, A. & VAN MARCK, E. (1999). Schistosomal granuloma modulation. II. Specific immunogenic carbohydrates can modulate schistosome-egg-antigen-induced hepatic granuloma formation. *Parasitology Research* **85**, 14–18.
- JAMES, S. L. & COLLEY, D. G. (1976). Eosinophil-mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. *Journal of the Reticuloendothelial Society* **20**, 359–374.
- JANKOVIC, D., CHEEVER, A. W., KULLBERG, M. C., WYNN, T. A., YAP, G., CASPAR, P., LEWIS, F. A., CLYNES, R., RAVETCH, J. V. & SHER, A. (1998). CD4+ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. *Journal of Experimental Medicine* **187**, 619–629.
- JORDÁN, F. & SCHEURING, I. (2004). Network ecology: topological constraints on ecosystem dynamics. *Physics of Life Reviews* **1**, 139–172.
- KAREVA, I. (2015). Cancer ecology: Niche construction, keystone species, ecological succession, and ergodic theory. *Biological Theory* **10**, 283–288.
- KAY, J. J. (1991). A nonequilibrium thermodynamic framework for discussing ecosystem integrity. *Environmental Management* **15**, 483–495.
- KHALIFE, J., DUNNE, D. W., RICHARDSON, B. A., MAZZA, G., THORNE, K. J., CAPRON, A. & BUTTERWORTH, A. E. (1989). Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Immunology* **142**, 4422–4427.
- KHALIL, R. M., LUZ, A., MAILHAMMER, R., MOELLER, J., MOHAMED, A. A., OMRAN, S., DORMER, P. & HÜLTNER, L. (1996). *Schistosoma mansoni* infection in mice augments the capacity for interleukin 3 (IL-3) and IL-9 production and concurrently enlarges progenitor pools for mast cells and granulocytes-macrophages. *Infection and Immunity* **64**, 4960–4966.
- KREBS, C. J. (1989). *Ecological Methodology*. Harper and Row, New York.
- KROES, H. W. (1977). The niche structure of ecosystems. *Journal of Theoretical Biology* **65**, 317–326.
- KUBOTA, H., AVARBOCK, M. R. & BRINSTER, R. L. (2004). Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biology of Reproduction* **71**, 722–731.
- LEIBOLD, M. A. (1995). The niche concept revisited: mechanistic models and community context. *Ecology* **76**, 1371–1382.
- LEMON, P. C. (1949). Successional responses of herbs in the longleaf-slash pine forest after fire. *Ecology* **30**, 135–145.
- LENZI, H. L., KIMMEL, E., SCHECHTMAN, H., PELAJO-MACHADO, M., ROMANHA, W. S., PACHEGO, R. G., MARIANO, M. & LENZI, J. A. (1998). Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **93**, 141–151.
- LENZI, H. L., KIMMEL, E., SCHECHTMAN, H., PELAJO-MACHADO, M., VALE, B. S., PANASCO, M. D. S. & LENZI, J. A. (1999). Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **32**, 639–643.
- LENZI, H. L., LENZI, J. A., KERR, I. B., ANTUNES, S. L. G., MOTA, E. M. & OLIVEIRA, D. N. (1991). Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **86**, 77–90.

- LENZI, H. L., ROMANHA, W. D. S., SANTOS, R. M., ROSAS, A., MOTA, E. M., MANSO, P. P. A., CAPUTO, L. F. G. & PELAJO-MACHADO, M. (2006). Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: fractal arrangement, internal regulation, autopoietic component and closure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **101**, 219–231.
- LENZI, H. L., ROMANHA, W. S. & PELAJO-MACHADO, M. (2004). *Possíveis níveis de complexidade na modelagem de sistemas biológicos. Pode a matemática coreografar a dança biológica? Notas em Matemática Aplicada: Modelagem em Bioinformática*. Sociedade Brasileira de Matemática Aplicada e Computacional, São Carlos.
- LENZI, H. L., ROMANHA, W. D. S., MACHADO, M. P., MOTA, E. M. & LENZI, J. A. (2008). *Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomático*. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- LENZI, H. L., SOBRAL, A. C. L. & LENZI, J. A. (1987). In vivo kinetics of eosinophils and mast cells in experimental murine schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **82**, 67–76.
- LEVIN, S. A. (1998). Ecosystems and the biosphere as complex adaptive systems. *Ecosystems* **1**, 431–436.
- LIN, H. (2002). The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nature Reviews Genetics* **3**, 931–940.
- LINS, R. A. B., DE LIMA CAVALCANTI, C. B., ARAÚJO-FILHO, J. L. S., DE MELO-JÚNIOR, M. R. & CHAVES, M. E. C. (2008). Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **41**, 173–178.
- LU, P., WEAVER, V. M. & WEBB, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology* **196**, 395–406.
- LUKACS, N. W., CHENSUE, S. W., SMITH, R. E., STRIETER, R. M., WARMINGTON, K., WILKE, C. & KUNKEL, S. L. (1994). Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha by inflammatory granuloma fibroblasts. *The American Journal of Pathology* **144**, 711.
- LUKACS, N. W., KUNKEL, S. L., STRIETER, R. M., WARMINGTON, K. & CHENSUE, S. W. (1993). The role of macrophage inflammatory protein 1 alpha in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* **177**, 1551–1559.
- LUKEN, J. O. (1990). *Directing Ecological Succession*. Springer Science & Business Media, London.
- LUNDIE, R. J., WEBB, L. M., MARLEY, A. K., PHYTHIAN-ADAMS, A. T., COOK, P. C., JACKSON-JONES, L. H., MAIZELS, R. M., BOON, L., O'KEEFE, M. & MACDONALD, A. S. (2016). A central role for hepatic conventional dendritic cells in supporting Th2 responses during helminth infection. *Immunology and Cell Biology* **94**, 400–410.
- LUNDY, S. K., LERMAN, S. P. & BOROS, D. L. (2001). 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* **69**, 271–280.
- MACARTHUR, R. H. (1958). Population ecology of some warblers of northeastern coniferous forests. *Ecology* **39**, 599–619.
- MACLEAN, A. L., FILIPPI, S. & STUMPF, M. P. (2014). The ecology in the hematopoietic stem cell niche determines the clinical outcome in chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 3883–3888.
- MAGOMBEDZE, G. & MARINO, S. (2018). Mathematical and computational approaches in understanding the immunobiology of granulomatous diseases. *Current Opinion in Systems Biology* **12**, 1–11.
- MARGALEF, R. (1958). *Temporal Succession and Spatial Heterogeneity in Phytoplankton*. University of California, Oakland.
- MARIANO, M. (1995). The experimental granuloma: A hypothesis to explain the persistence of the lesion. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **37**, 161–176.
- MARTIN, C. J., CAREY, A. F. & FORTUNE, S. M. (2016). A bug's life in the granuloma. *Seminars in Immunopathology* **38**, 213–220.
- MATHEW, R. C. & BOROS, D. L. (1986). Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infection and Immunity* **54**, 820–826.
- MCINTOSH, R. P. (1981). *Succession and Ecological Theory*. Forest Succession. Springer, New York.
- MCMANUS, D. P., DUNNE, D. W., SACKO, M., UTZINGER, J., VENNERSVALD, B. J. & ZHOU, X. N. (2018). Schistosomiasis. *Nature Reviews Disease Primers* **4**, 13.
- MEEUSEN, E. N. T. & BALIC, A. (2000). Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitology Today* **16**, 95–101.
- MILLER, H. R. P., NEWLANDS, G. F. J., MCKELLAR, A., INGLIS, L., COULSON, P. S. & WILSON, R. A. (1994). Hepatic recruitment of mast cells occurs in rats but not mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* **16**, 145–155.
- MILLER, P. W., MOTE, T. L. & RAMSEYER, C. A. (2019). An empirical study of the relationship between seasonal precipitation and thermodynamic environment in Puerto Rico. *Weather and Forecasting* **34**, 277–288.
- MOORE, D. L., GROVE, D. I. & WARREN, K. S. (1977). The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell population. *The Journal of Pathology* **121**, 41–50.
- MORAIS, S. B., FIGUEIREDO, B. C., ASSIS, N. R., ALVARENGA, D. M., DE MAGALHÃES, M. T., FERREIRA, R. S., VIEIRA, A. T., MENEZES, G. B. & OLIVEIRA, S. C. (2018). *Schistosoma mansoni* SmKI-1 serine protease inhibitor binds to elastase and impairs neutrophil function and inflammation. *PLoS Pathogens* **14**, e1006870.
- MOROWITZ, H. & SMITH, E. (2007). Energy flow and the organization of life. *Complexity* **13**, 51–59.
- MORRISON, S. J. & SPRADLING, A. C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* **132**, 598–611.
- NAITO, M., HASEGAWA, G., EBE, Y. & YAMAMOTO, T. (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. *Medical Electron Microscopy* **37**, 16–28.
- NDLOVU, H., NONO, J. K., ABDEL AZIZ, N., NIEUWENHUIZEN, N. E. & BROMBACHER, F. (2018). Interleukin-4 receptor alpha expressing B cells are essential to down-modulate host granulomatous inflammation during schistosomiasis. *Frontiers in Immunology* **9**, 2928.
- NEWLANDS, G. F. J., COULSON, P. S. & WILSON, R. A. (1995). Stem cell factor dependent hyperplasia of mucosal-type mast cells but not eosinophils in *Schistosoma mansoni*-infected rats. *Parasite Immunology* **17**, 595–598.
- ODUM, E. P. (1966). The strategy of Ecosystem development. *Science* **164**, 262–270.
- ODUM, E. P. & BARRET, G. W. (2005). *Fundamentals of Ecology*. Thomson Brooks/Cole, Belmont.
- ODUM, E. P. & PINKERTON, R. C. (1955). Time's speed regulator: the optimum efficiency for maximum power output in physical and biological systems. *American Scientist* **43**, 331–343.
- PAGÁN, A. J. & RAMAKRISHNAN, L. (2018). The formation and function of granulomas. *Annual Review of Immunology* **36**, 639–665.
- PAIVA, L. A., MAYA-MONTEIRO, C. M., BANDEIRA-MELO, C., SILVA, P. M., EL-CHEIKH, M. C., TEODORO, A. J., BOROJEVIC, R., PEREZ, S. A. C. & BOZZA, P. T. (2010). Interplay of cysteinyl leukotrienes and TGF- β in the activation of hepatic stellate cells from *Schistosoma mansoni* granulomas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1801**, 1341–1348.
- PAPAYANNOPOULOU, T. & SCADDEN, D. T. (2008). Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **111**, 3923–3930.
- PARK, T. (1934). The effect of conditioned flour upon the productivity and population decline of *Tribolium confusum*. *Journal of Experimental Zoology* **68**, 167–182.
- PATTEN, B. C. & ODUM, E. P. (1981). The cybernetic nature of ecosystems. *The American Naturalist* **118**, 886–895.
- PEET, R. K. & CHRISTENSEN, N. L. (1980). *Succession: A Population Process*. Springer, Dordrecht.
- PELTZER, D. A., WARDLE, D. A., ALLISON, V. J., BAISDEN, W. T., BARDGETT, R. D., CHADWICK, O. A., CONDRON, L. M., PARFITT, R. L., PORDER, S., RICHARDSSON, B. L. T., VITOUSEK, P. M., WALKER, J. & WALKER, L. R. (2010). Understanding ecosystem retrogression. *Ecological Monographs* **80**, 509–529.
- PENCZYKOWSKI, R. M., PARRATT, S. R., BARRÈS, B., SALLINEN, S. K. & LAINE, A. L. (2018). Manipulating host resistance structure reveals impact of pathogen dispersal and environmental heterogeneity on epidemics. *Ecology* **99**, 2853–2863.
- PHILLIPS, S. M., DICONZA, J. J., GOLD, J. A. & REID, W. A. (1977). Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse: I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation, and host morbidity. *The Journal of Immunology* **118**, 594–599.
- PIENTA, K. J., MCGREGOR, N., AXELROD, R. & AXELROD, D. E. (2008). Ecological therapy for cancer: defining tumors using an ecosystem paradigm suggests new opportunities for novel cancer treatments. *Translational Oncology* **1**, 158–164.
- PRAGER, B. C., XIE, Q., BAO, S. & RICH, J. N. (2019). Cancer stem cells: the architects of the tumor ecosystem. *Cell Stem Cell* **24**, 41–53.
- PRENDERGAST, C. T., SANIN, D. E. & MOUNTFORD, A. P. (2016). CD4 T-cell hyporesponsiveness induced by schistosome larvae is not dependent upon eosinophils but may involve connective tissue mast cells. *Parasite Immunology* **38**, 81–92.
- RASO, P., RASO, L. A. M., MELO, F. D. A. & TAFURI, W. L. (2012). *Schistosoma mansoni* granuloma in late evolutive phase, in a case of tumoral form in man. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **45**, 627–632.
- REIS, L. F., VENTURA, T. G., SOUZA, S. O., ARANA-PINO, A., PELAJO-MACHADO, M., PEREIRA, M. J. S., PEREIRA, M. J. S., LENZI, H. L., CONCEIÇÃO, M. J. & TAKIYA, C. M. (2001). Quantitative and qualitative interferences of pentoxifylline on hepatic *Schistosoma mansoni* granulomas: effects on extracellular matrix and eosinophil population. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**, 107–112.
- RICKLEFS, R. E. & COX, G. W. (1978). Stage of taxon cycle, habitat distribution, and population density in the avifauna of the West Indies. *The American Naturalist* **112**, 875–895.
- ROLLINSON, D., KNOPP, S., LEVITZ, S., STOTHARD, J. R., TCHUENTÉ, L. A. T., GARBA, A., MOHAMED, K. A., SCHUR, N., PERSON, B., COLLEY, D. G. & UTZINGER, J. (2013). Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Tropica* **128**, 423–440.
- ROSSI, M. I. D., DUTRA, H. S., EL-CHEIKH, M. C., BONOMO, A. & BOROJEVIC, R. (1999). Extramedullary B lymphopoiesis in liver schistosomal granulomas: presence

- of the early stages and inhibition of the full B cell differentiation. *International Immunology* **11**, 509–518.
- RUMBLEY, C. A., SUGAYA, H., ZEKAVAT, S. A., EL REFAEI, M., PERRIN, P. J. & PHILLIPS, S. M. (1999). Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. *The Journal of Immunology* **162**, 1003–1009.
- RUMBLEY, C. A., SUGAYA, H., ZEKAVAT, S. A., PERRIN, P. J. & PHILLIPS, S. M. (2001). Elimination of lymphocytes, but not eosinophils, by Fas-mediated apoptosis in murine schistosomiasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **65**, 442–449.
- RUMBLEY, C. A., ZEKAVAT, S. A., SUGAYA, H., PERRIN, P. J., RAMADAN, M. A. & PHILLIPS, S. M. (1998). The schistosome granuloma: characterization of lymphocyte migration, activation, and cytokine production. *The Journal of Immunology* **161**, 4129–4137.
- SCHOFFIELD, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7–25.
- SCHOOK, L. B., WELLHAUSEN, S. R., BOROS, D. L. & NIEDERHUBER, J. E. (1983). Accessory cell function of liver granuloma macrophages of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Infection and Immunity* **42**, 882–886.
- SCHRAMM, G., FALCONE, F. H., GRONOW, A., HAISCH, K., MAMAT, U., DOENHOFF, M. J., OLIVEIRA, G., GALLE, J., DAHINDEN, C. A. & HAAS, H. (2003). Molecular characterization of an interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 18384–18392.
- SCHRAMM, G., MOHR, K., WODRICH, M., DOENHOFF, M. J., PEARCE, E. J., HAAS, H. & MOHR, M. (2007). Cutting edge: IPSE/alpha-1, a glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, induces IgE-dependent, antigen-independent IL-4 production by murine basophils in vivo. *The Journal of Immunology* **178**, 6023–6027.
- SCHWARTZ, C. & FALLON, P. G. (2018). *Schistosoma* “eggs-iting” the host: granuloma formation and egg excretion. *Frontiers in Immunology* **9**, 2492.
- SCHWARTZ, C., OESER, K., DA COSTA, C. P., LAYLAND, L. E. & VOEHRINGER, D. (2014). T cell-derived IL-4/IL-13 protects mice against fatal *Schistosoma mansoni* infection independently of basophils. *The Journal of Immunology* **193**, 3590–3599.
- SHER, A. & COFFMAN, R. L. (1992). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annual Review of Immunology* **10**, 385–409.
- SIEWE, N., YAKUBU, A. A., SATOSKAR, A. R. & FRIEDMAN, A. (2017). Granuloma formation in leishmaniasis: a mathematical model. *Journal of Theoretical Biology* **412**, 48–60.
- SOMBETZKI, M., FÜCHS, C. D., FICKERT, P., ÖSTERREICHER, C. H., MUELLER, M., CLAUDEL, T., LOEBERMANN, M., ENGELMANN, R., LANGNER, C., SAHIN, E., SCWINGE, D., GUENTHER, N. D., SCHRAMM, C., MUELLER-HILKE, B., REISINGER, E. C., et al. (2015). 24-nor-ursodeoxycholic acid ameliorates inflammatory response and liver fibrosis in a murine model of hepatic schistosomiasis. *Journal of Hepatology* **62**, 871–878.
- SOUTHWOOD, T. R. (1977). Habitat, the templet for ecological strategies? *Journal of Animal Ecology* **46**, 337–365.
- STEIDL, C. (2017). The ecosystem of classical Hodgkin lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **130**, 2360–2361.
- STEINFELDER, S., ANDERSEN, J. F., CANNONS, J. L., FENG, C. G., JOSHI, M., DWYER, D., CASPAR, P., SCHWARTZBERG, P. L., SHER, A. & JANKOVIC, D. (2009). The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *Journal of Experimental Medicine* **206**, 1681–1690.
- STEINMANN, P., KEISER, J., BOS, R., TANNER, M. & UTZINGER, J. (2006). Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet Infectious Diseases* **6**, 411–425.
- SUTHERLAND, R. M. (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* **240**, 177–184.
- SWARTZ, J. M., DYER, K. D., CHEEVER, A. W., RAMALINGAM, T., PESNICK, L., DOMACHOWSKIE, J. B., LEE, J. L., LEE, N. A., FOSTER, P. S., WYNN, T. A. & ROSENBERG, H. F. (2006). *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood* **108**, 2420–2427.
- TWEYONGYERE, R., NAMANYA, H., NANIIMA, P., COSE, S., TUKAHEBWA, E. M., ELLIOTT, A. M., DUNNE, D. W. & WILSON, S. (2016). Human eosinophils modulate peripheral blood mononuclear cell response to *Schistosoma mansoni* adult worm antigen in vitro. *Parasite Immunology* **38**, 516–522.
- ULANOWICZ, R. E. (1972). Mass and energy flow in closed ecosystems. *Journal of Theoretical Biology* **34**, 239–253.
- VAN DER KLEIJ, D., LATZ, E., BROUWERS, J. F., KRUIZE, Y. C., SCHMITZ, M., KURT-JONES, E. A., ESPEVIK, T., JONG, E. C., KAPSENBER, M. L., GOLENBOCK, D. T., TEILENS, A. G. M. & YAZDANBAKHS, M. (2002). A novel host-parasite lipid cross-talk: schistosomal lyso-phosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 48122–48129.
- VAN LIEMPT, E., VAN VLIET, S. J., ENGERING, A., VALLEJO, J. J. G., BANK, C. M., SANCHEZ-HERNANDEZ, M., VAN KOOPY, Y. & VAN DIE, I. (2007). *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Molecular Immunology* **44**, 2605–2615.
- VITOUSEK, P. M., MATSON, P. A. & VAN CLEVE, K. (1989). Nitrogen availability and nitrification during succession: primary, secondary, and old-field seres. *Plant and Soil* **115**, 229–239.
- VON LICHTENBERG, F., ERICKSON, D. G. & SADUN, E. H. (1973). Comparative histopathology of schistosome granulomas in the hamster. *The American Journal of Pathology* **72**, 149.
- WAGENDORP, T., GULINCK, H., COPPIN, P. & MUYS, B. (2006). Land use impact evaluation in life cycle assessment based on ecosystem thermodynamics. *Energy* **31**, 112–125.
- WALKER, J. & REDDELL, P. (2007). Retrogressive succession and restoration on old landscapes. In *Linking Restoration and Ecological Succession*. Springer, New York.
- WALKER, L. R. & WARDLE, D. A. (2014). Plant succession as an integrator of contrasting ecological time scales. *Trends in Ecology & Evolution* **29**, 504–510.
- WASSOM, D. L. (1993). Immunoeological succession in host-parasite communities. *The Journal of Parasitology* **79**, 483–487.
- WEINSTOCK, J. V. & BLUM, A. M. (1987). 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* **108**, 452–459.
- WHITTAKER, R. H. (1953). A consideration of climax theory: the climax as a population and pattern. *Ecological Monographs* **23**, 41–78.
- WHITTAKER, R. H., LEVIN, S. A. & ROOT, R. B. (1973). Niche, habitat, and ecotope. *The American Naturalist* **107**, 321–338.
- WHO (2011). Schistosomiasis. World Health Organization progress report 2001–2011 and strategic plan 2010–2020.
- WOOTTON, J. T. & EMMERSON, M. (2005). Measurement of interaction strength in nature. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**, 419–444.
- WYLER, D. J., WAHL, S. M., CHEEVER, A. W. & WAHL, L. M. (1981). Fibroblast stimulation in schistosomiasis. I. Stimulation in vitro of fibroblasts by soluble products of egg granulomas. *Journal of Infectious Diseases* **144**, 254–262.
- WYNN, T. A. & BARRON, L. (2010). Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Seminars in Liver Disease* **30**, 245–257.
- WYNN, T. A. & CHEEVER, A. W. (1995). Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Current Opinion in Immunology* **7**, 505–511.
- WYNN, T. A., THOMPSON, R. W., CHEEVER, A. W. & MENTINK-KANE, M. M. (2004). Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Reviews* **201**, 156–167.
- XU, F., YANG, Z. F., CHEN, B. & ZHAO, Y. W. (2012). Ecosystem health assessment of Baiyangdian Lake based on thermodynamic indicators. *Procedia Environmental Sciences* **13**, 2402–2413.
- YAP, G., CHEEVER, A., CASPAR, P., JANKOVIC, D. & SHER, A. (1997). 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* **65**, 2583–2586.
- YONEYAMA, H. & ICHIDA, T. (2005). Recruitment of dendritic cells to pathological niches in inflamed liver. *Medical Molecular Morphology* **38**, 136–141.
- ZHENG, B., ZHANG, J., CHEN, H., NIE, H., MILLER, H., GONG, Q. & LIU, C. (2020). T lymphocyte-mediated liver immunopathology of schistosomiasis. *Frontiers in Immunology* **11**, 61.
- ZHOU, X., MURPHY, F. R., GEHDE, N., ZHANG, J., IREDALE, J. P. & BENYON, R. C. (2004). Engagement of $\alpha\beta 3$ integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 23996–24006.

(Received 27 July 2020; revised 26 February 2021; accepted 1 March 2021)

5 CAPÍTULO 2

Schistosomiasis mansoni-recruited eosinophils: an overview in the granuloma context

Este capítulo é composto pela publicação no periódico *Microorganisms* (FI: 4.93 Qualis B1). Ele foi reproduzido no presente trabalho com autorização [Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)].

Aqui discutimos os possíveis papéis de eosinófilos, uma das principais populações celulares recrutadas durante a esquistossomose mansônica. Essas células migram ativamente e se acumulam em granulomas, a principal característica patológica dessa doença. Os eosinófilos colonizam os granulomas como uma população celular robusta e estabelecem interações complexas com outras células imunes e com o microambiente do granuloma. Os eosinófilos são as células mais abundantes nos granulomas induzidos pela infecção pelo *Schistosoma mansoni*, mas suas funções durante esta doença permanecem obscuras e até mesmo controversas. Aqui, exploramos as informações atuais sobre os eosinófilos como componentes dos granulomas do *Schistosoma mansoni* em humanos e em modelos naturais e experimentais e seu significado potencial como células centrais desencadeadas por esta infecção.



Review

Schistosomiasis Mansoni-Recruited Eosinophils: An Overview in the Granuloma Context

Kássia K. Malta , Cinthia Palazzi, Vitor H. Neves , Yasmin Aguiar, Thiago P. Silva and Rossana C. N. Melo *

Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora 36036-900, MG, Brazil

* Correspondence: rossana.melo@uff.br; Tel.: +55-32-98834-0999

Abstract: Eosinophils are remarkably recruited during schistosomiasis mansoni, one of the most common parasitic diseases worldwide. These cells actively migrate and accumulate at sites of granulomatous inflammation termed granulomas, the main pathological feature of this disease. Eosinophils colonize granulomas as a robust cell population and establish complex interactions with other immune cells and with the granuloma microenvironment. Eosinophils are the most abundant cells in granulomas induced by *Schistosoma mansoni* infection, but their functions during this disease remain unclear and even controversial. Here, we explore the current information on eosinophils as components of *Schistosoma mansoni* granulomas in both humans and natural and experimental models and their potential significance as central cells triggered by this infection.



Citation: Malta, K.K.; Palazzi, C.; Neves, V.H.; Aguiar, Y.; Silva, T.P.; Melo, R.C.N. Schistosomiasis Mansoni-Recruited Eosinophils: An Overview in the Granuloma Context. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102022>

Academic Editors: Célio Geraldo Freire-de-Lima, Debora Decote-Ricardo, Alexandre Morrot, Leonardo Freire-de-Lima and Danielle de Oliveira Nascimento

Received: 15 September 2022

Accepted: 9 October 2022

Published: 13 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: *Schistosoma mansoni*; schistosomiasis; eosinophils; granuloma; hepatic granuloma; histopathology; eosinophil degranulation; inflammation

1. Introduction

Schistosomiasis, a neglected tropical disease caused by the trematode worms from the genus *Schistosoma*, persists as an illness of significant socioeconomic impact, with transmission being reported in 78 countries. Humans are infected after exposure to freshwater contaminated with free-swimming schistosome cercariae released by water snails (intermediate hosts). Human schistosomiasis is a complex disease that affects multiple organs—mainly, the liver and intestines—and has a wide range of clinical manifestations [1,2].

A key feature of the human infection with *Schistosoma mansoni* parasites, the only *Schistosoma* species that occurs in the Americas, is the development of marked eosinophilia. Following blood eosinophilia, eosinophils and other immune cells migrate to specific sites of infection, accumulating around parasite eggs that become trapped in host tissues [3–5]. These immune cell aggregates—termed granulomas—are compact, highly organized structures with a plethora of cells playing different roles while interacting with each other. Despite an extensive history of research undertaken to understand the role of eosinophils during *S. mansoni* infection, their functions remain unclear or even controversial, and there is considerable debate as to whether they act as effectors, immunomodulators, or merely remodeling operators [6–9]. Here, we explore the current information on eosinophils as components of schistosomal granulomatous inflammation and their potential significance as central cells triggered by *Schistosoma mansoni* infection.

2. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* Infection

2.1. The Host Immune Response

Schistosoma worms have a life cycle involving an aquatic snail intermediate host and a definitive mammalian host. During contact with contaminated freshwater, schistosome cercariae actively penetrate the mammalian host's skin, transforming into schistosomula forms of the parasite that migrate into the lungs through venous circulation and then

to the liver, where the parasites mature. The adult *S. mansoni* worms mate by pairing and migrating to the mesenteric veins of the intestines, where oviposition occurs [1,2]. From there, eggs can be transported through the intestinal mucosa and expelled by the host [1,2,10].

The initial immune response of the acute *S. mansoni* infection is mostly caused by the schistosomula and the juvenile worm stages and is characterized by a typical T helper type 1 (Th1) profile with the expression of the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ), and the interleukins (IL) IL-1, IL-2, and IL-12 [10–12]. This Th1 reaction can cause dry cough, fever, and angioedema, accompanied by blood eosinophilia [1,13].

Soluble egg antigens (SEA) are strong inducers of type 2 immunity [14,15]. Thus, with the onset of the egg deposition, the immune response begins a progressive switch towards a T helper type 2 (Th2) profile, characterized by the presence of IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13, together with the active production of immunoglobulin E [10–12,16]. Although the eggs are transported through the intestinal wall to be eliminated with the fecal material for the continuity of the *Schistosoma* life cycle, a large proportion of them can stay trapped in the intestinal wall or even be directed to other organs—mainly, the liver [17]. Eggs from *S. mansoni* can also be ectopically located in the spleen [18], lungs [18,19], reproductive system [20], and central nervous system [21,22].

With the disease progression, there is a downmodulation of the Th2 response and a minor increase in the Th1 environment, achieving a more balanced inflammatory profile [16]. This may be due to the action of T regulatory cells (Tregs) and B regulatory cells (Bregs), which reduce Th2 inflammation via an IL-10-mediated pathway [23–26], thereby immunoregulating the Th1/Th2 balance. This alteration in the immune profile marks the transition from the acute phase of schistosomiasis to the chronic condition [16]. In this phase, there is a reduction of the egg-induced inflammatory response, consequently changing the granulomatous inflammation, with granulomas tending to be smaller and more fibrous [27]. Indeed, our group has shown that, in experimental models of chronic hepatic schistosomiasis, there was a higher frequency of granulomas at the late stages of development compared to the acute phase [28].

2.2. The Granuloma Architecture

Granulomas are the most prominent pathological feature of schistosomiasis that arises as a result of persistent antigenic stimulation [7,27,29]. *Schistosoma* granulomas can be defined as a compact assembly of inflammatory and resident cells forming a well-defined structure surrounding the parasite eggs [30,31]. T and B cells, as well as their subsets; neutrophils; eosinophils; basophils; mast cells; resident macrophages (Kupffer cells); inflammatory and differentiated macrophages (epithelioid and giant cells); hepatic stellate cells; and fibroblasts compose an intricate cell community within the *Schistosoma* granuloma [7].

The formation of granulomas during *Schistosoma mansoni* infection is considered a protective mechanism—a physical barrier between the egg and the surrounding tissue that minimizes tissue damage from products released by the parasite eggs [7,17,29,32,33]. In fact, the cell community stimulates and produces a collagen-rich extracellular matrix (ECM) within the granuloma, forming a tightly packed construct that isolates the *Schistosoma* egg, avoiding the contact of its antigens and excreted toxins with the host tissue [29]. Paradoxically, the extensive inflammation and collagen deposition caused by the granulomatous response are the main causes of tissue damage and pathology during schistosomiasis [29]. In the intestines, the granulomatous inflammation will lead to bleeding, microulcerations, and pseudopolyposis [1], while in the liver, it results in hepatomegaly and can generate periportal fibrosis with the occlusion of smaller portal branches, a severe pathology associated with portal hypertension and death [1,34,35].

The cell collection greatly varies among different *Schistosoma* species-induced granulomas. For instance, while, in *S. japonicum* granulomas, neutrophils are the most abundant cells, *S. mansoni* granulomas are characterized by massive eosinophil infiltrates [31].

Schistosoma granulomas are dynamic structures whose formation follows specific events associated with cell migration, cell–cell, cell–egg, and cell–ECM interactions [7,27]. Because of this dynamism and complexity, granulomas have a remarkable morphological variation, showing a variety of sizes and cellular compositions depending on their developmental stages [28,32,33].

Based on extensive histopathological studies, it is well documented that *Schistosoma* granulomas undergo different stages during their formation, progressing from a maturative to an involutinal state (Figure 1A). Thus, two main stages are recognized in the granuloma construction: a pre-granulomatous stage, in which the inflammatory cells start their organization around the parasite egg, and a granulomatous stage, highly organized and characterized by progressive phases. Classically, the nomenclature for the *Schistosoma* granulomas, including the initial and three progressive stages, is the following: (i) pre-granulomatous exudative (PE), in which the first collection of cells accumulates in the host tissues around the parasite eggs; (ii) necrotic-exudative (NE), identified by a higher density and complexity of inflammatory cells that are irregularly distributed in different layers with a central necrotic area around the egg; (iii) exudative-productive (EP), a more organized granuloma with a well-defined circumferential aspect characterized by a rich structure of collagen fibers and inflammatory cells concentrated in the granuloma's periphery; and (iv) productive (P), identified by the presence of small numbers of inflammatory cells and a thick band of collagen fibers surrounding the egg [28,32] (Figure 1A).

Our group has provided the first detailed characterization of granulomas in the target organs (liver and intestines) of experimental models of schistosomiasis with the use of whole slide imaging (WSI) [28]. This technique allows for the scanning of the entire tissue sections for a comprehensive histopathological analysis, including the quantitative evaluation of granuloma morphological aspects (number, size, evolutionary types, frequency, tissue areas occupied by them in the target organs, as well as the assessment of non-granulomatous inflammation). We showed that all four of these granuloma developmental stages are found within the liver, while only the PE and EP stages were clearly identified in the intestines [28]. This could be related to the more transient aspect of *Schistosoma mansoni*-induced intestinal granulomas.

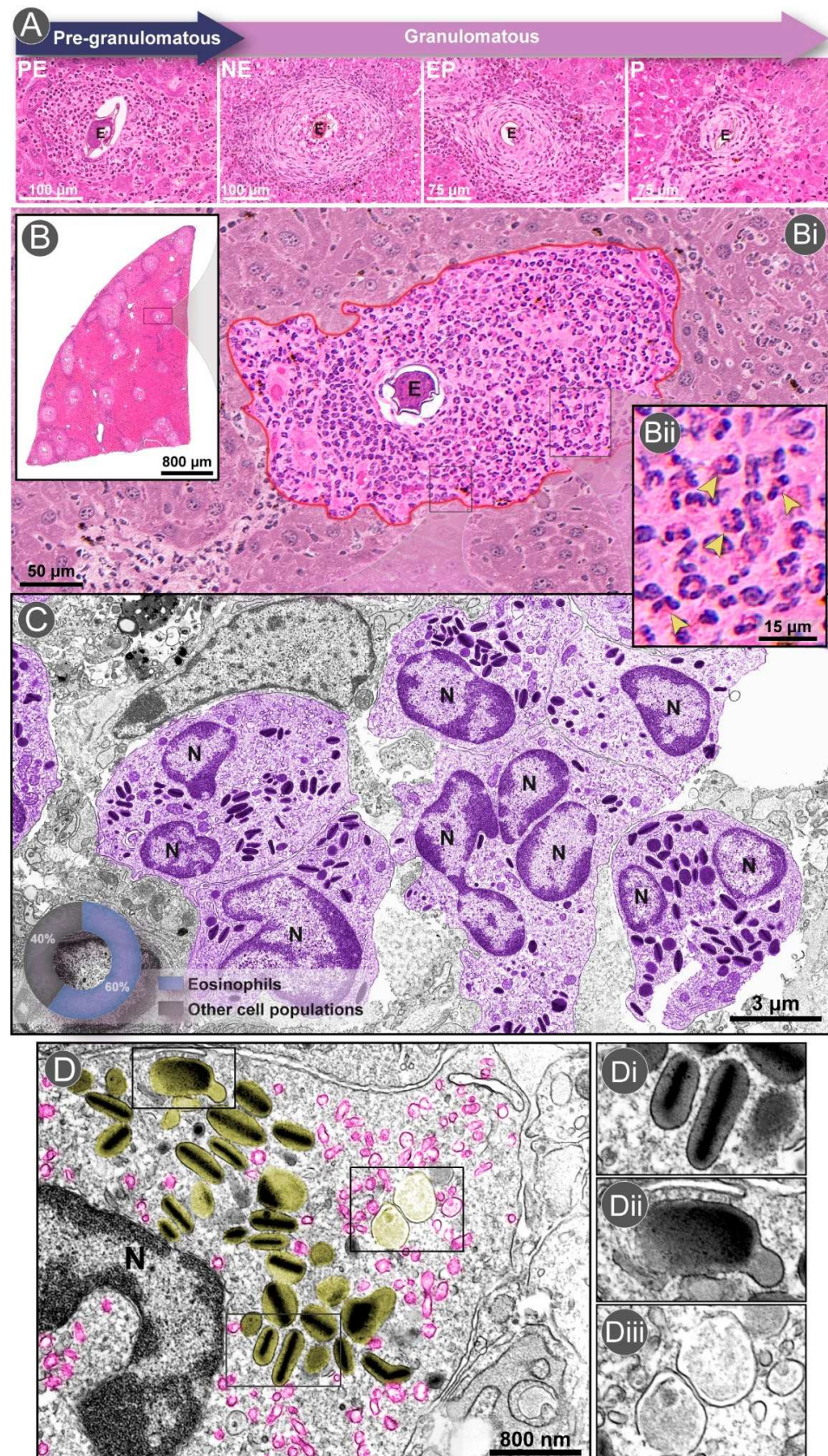


Figure 1. Eosinophils in a hepatic *Schistosoma mansoni* granuloma. (A) Evolutional stages of the hepatic granuloma and their features: Pre-granulomatous exudative (PE), with an initial infiltration of inflammatory cells in the organization process around the parasite egg (E); Necrotic-exudative (NE),

with an area of necrosis in the periovular region around the egg (E) and numerous inflammatory cell types irregularly distributed on subsequent layers; Exudative-productive (EP), more organized and circumferential, with a rich structure of collagen and inflammatory cells concentrated in the periphery; and Productive (P), with a thick band of collagen fibers surrounding the egg (E) and a reduced number of inflammatory cells. (B) A representative whole-slide image of the hepatic tissue showing many granulomas (box). (Bi) A PE granuloma (outlined in red) forms around the parasite egg (E). (Bii) At a higher magnification, observe the accumulation of eosinophils (arrowheads). (C,D) Infiltrated eosinophils (colored in purple in C), seen under transmission electron microscopy (TEM), show their typical ultrastructure with a polylobed nucleus (N) and a high number of cytoplasmic-specific (secretory) granules (colored in yellow in D). Eosinophils represent 60% of all granuloma cells in hepatic NE granulomas [36]. (D) A representative eosinophil shows morphological signs of piecemeal degranulation (PMD), characterized by the presence of enlarged, non-fused granules releasing their content and a high number of transport vesicles (pink), predominantly around emptying granules (yellow). (Di) Intact granules with their unique morphology: a central well-defined electron-dense crystalline core and an outer electron-lucent matrix; (Dii,Diii) Swollen granules with disarranged cores and matrices denote PMD. Liver fragments from experimentally infected (acute phase) mice were prepared for light microscopy (A,B) and conventional TEM (C,D), as before [36]. Histological sections (A,B,Bi,Bii) were stained with Hematoxylin-Eosin. Panels (D–Diii) were republished from ref. [36] under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0 (CC-By).

3. Eosinophil Dynamics within the Granuloma

3.1. Eosinophil Recruitment and Accumulation

Eosinophils are actively recruited during schistosomiasis caused by the parasite *S. mansoni*, as extensively documented in humans [1,5,10,37–39] and experimental models [39–44]. Acute schistosomiasis is characterized by increased numbers of eosinophils in the circulation, peritoneal cavity, and target organs (mainly, the liver, intestines, and lungs), with blood eosinophilia being observed even before egg deposition in the target tissues [40,45–48]. Oviposition can further stimulate more pronounced blood eosinophilia, as noted in patients with acute infection [5,10,37]. Tissue eosinophilia is found during the early stages of granuloma formation within the inner perimeter of circumoval inflammation, as detected by immunolabeling with Siglec-F [49], an eosinophil surface receptor considered a marker for this cell [50,51]. The chronic phase is generally associated with reduced blood eosinophilia, since studies on the chronic phase of *S. mansoni* infection in humans have shown eosinophilia in less than 50% of subjects [52,53].

Histopathological quantitative analyses in experimental models showed that the eosinophil is the most abundant cell type in both the acute and chronic phases of the infection. In hepatic granulomas, eosinophils compose 60% of all cell populations in the acute phase (55 days post-infection) (Figure 1B,C) and 45% of all cells in the chronic phase (120 days post-infection) [28]. Prior studies have shown that, even in early infections (16 days post-infection), the proportion of eosinophils can reach 70% of granuloma cells [54]. Ultrastructural analyses performed by our group revealed that eosinophils form tight groups of cells within hepatic granulomas developed during acute schistosomiasis (Figure 1C) and are seen interacting with each other and with other inflammatory cells [36,55] (see Section 3.4). In human biopsies, eosinophils can also be observed in the proximity of eggs deposited in the liver and intestines [3,56,57]. The major basic protein (MBP) secreted by these cells was associated with the formation of the phenomenon termed Splendore-Hoeppli (asteroid bodies), which is characterized by an eosinophilic hyaline fringe, often with a radiating or starlike configuration, that surrounds schistosome eggs in granulomas [56]. However, the nature of the Splendore–Hoeppli reaction, which is also described in other infectious diseases around parasites, fungi, bacteria, or even inert materials, is not well understood [58].

Eosinophils are recruited into inflammatory sites in response to several chemoattractant molecules. In the initial phase of granuloma formation, CD4+ T lymphocytes and other inflammatory cells release chemokines such as CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL11,

CCL12, CCL17, CCL22, and CCL24, which bind to their cognate receptors at the eosinophil surface and regulate eosinophil migration [27,59–64]. CCL11 is particularly important for eosinophil migration from circulation [27]. Eosinophils are also chemically attracted by sensitization with antibodies and complement [40,45], as well as antigens released by parasite eggs trapped in the target tissue. However, SEAs alone are unable to chemoattract the high number of eosinophils observed in the infected tissues [45,65,66].

Signaling from T-lymphocytes and other immune cell populations, such as dendritic cells, is essential to attracting and accumulating eosinophils into the granuloma ecosystem. CD4⁺ T lymphocytes release IL-5, a key cytokine that attracts eosinophils to the inflammatory tissue sites and also contributes to increased blood eosinophilia in association with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) under a Th2 environment [4,9,27,67–69]. Interestingly, the depletion of CD11c, a marker for dendritic cells, dramatically altered granuloma and hepatic cellularity, leading to decreased numbers of eosinophils and T cells [49,70].

3.2. Differential Distribution of Eosinophils within the Granuloma

In a recent review, we explored the hepatic *Schistosoma* granuloma as an “integrating and evolving ecosystem” with progressive structural and functional changes and not only as a place where a community of cells is settled [7]. In line with this perspective, it is not surprising that the numbers and distribution of eosinophils change during the granuloma’s development [33,71,72], i.e., these cells are not randomly distributed but rather occupy well-defined regions as the granuloma progresses. Thus, in the initial stage (pre-granulomatous) of the hepatic *Schistosoma* granuloma, eosinophils appear to be disorganized around the egg and in small numbers [28,71]. In the following PE stage, the numbers of eosinophils increase, and these cells are diffusely distributed throughout the granuloma, while in the NE, eosinophils are concentrated in the periphery and in the center of the granuloma. In the P stage, despite the beginning of fiber formation, eosinophils are still diffusely distributed throughout the granuloma [28,71]. Finally, it is described as a “healing phase” by fibrosis, in which they are concentrated in the periphery and in the center of the granuloma, being in smaller numbers than in the NE and P phases, but they are also seen inside the egg [71]. The meaning of this differential distribution within the granuloma awaits further investigation.

3.3. Are Eosinophils Produced Locally in *Schistosoma mansoni* Granulomas?

It is documented that extramedullary hematopoiesis can occur in association with *Schistosoma* granulomas, as observed in the livers of mice infected with *S. mansoni*—specifically, around blood vessels (perivascular hematopoiesis) and in the periphery of mature granulomas identified as EP [73–75]. These granuloma types are organized into three distinct zones separated by well-defined arrays of collagenous fibers: central or periovular, medial, and peripheral [28,71,74,75]. The peripheral zone is considered a perfect niche for the extramedullary hematopoiesis, since this region is populated with cells from myeloid lineage—mainly, eosinophils, neutrophils, and monocytes in different stages of maturation [75]. The clonal expansion of these cell lineages might be occurring within this granuloma zone in parallel to the release of immature cells from the bone marrow [75]. Hence, pluripotent precursors under the influence of hematopoietic growth factors might undergo local differentiation, thus potentially generating all the myeloid lineages [33,76,77]. Accordingly, by analyzing the ultrastructure of liver samples from experimental *S. mansoni* infection, we detected the presence of eosinophils exhibiting morphological features of immaturity (voluminous and less segmented nuclei, higher amounts of rough endoplasmic reticulum strands, and a small proportion of coreless secretory granules) as components of inflammatory infiltrates [78]. However, it is still unclear if these not completely differentiated tissue eosinophils denote cells undergoing extramedullary differentiation/maturation or merely cells that were released from the bone marrow with an unfinished process of maturation [78].

In mice deficient in CCL3, a chemokine involved in eosinophil maturation [63], both hepatic and pulmonary granulomas are smaller, and eosinophils show decreased peroxidase activity [79,80]. Moreover, other eosinophils, T cells, macrophages, hepatocytes, and Kupffer cells release in situ macrophage migration inhibitory factor (MIF), a molecule that participates in the IL-5-driven maturation of eosinophils and tissue eosinophilia associated with *S. mansoni* infection [81,82]. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9), a protein produced by neutrophils and involved in modulation processes of hematopoietic function, is also produced within the granuloma [75]. Finally, another recent study shows that even liver cells from infected mice have a greater potential to produce IL-5 as early as week 4 of infection, which could support not only the rapid recruitment of eosinophils during granuloma initiation and development [49] but also the local eosinophil differentiation. Altogether, the granuloma microenvironment is considered a niche favorable for eosinophil differentiation and maturation, but future studies are needed for a better understanding of these events.

3.4. Eosinophil Degranulation Mechanisms

A massive collection of proteins, including four cationic (basic) proteins, chemokines, growth factors, and many cytokines, are additionally stored as preformed products within the specific granules of eosinophils (reviewed in [64,78,83]). The high amounts of cationic proteins—specifically, MBP (also known as MBP-1 or PRG2), eosinophil cationic protein (ECP, also known as RNase3), EDN (also known as RNase 2), and eosinophil peroxidase (EPX, also known as EPO)—are responsible for the acidophilic nature of eosinophil secretory granules, which are easily identified in histological sections due to the high affinity for eosin (Figure 1(B–Bii)) and other acid stains.

The role of eosinophils relies on their ability to secrete their granule-derived immune mediators and other proteins, which is collectively referred to as degranulation [78]. Eosinophils can secrete their granule contents through differential degranulation processes: (i) exocytosis, (ii) piecemeal degranulation (PMD), and (iii) cytolysis, all of them identified in detail only with the application of transmission electron microscopy (TEM) [78]. Exocytosis, which is characterized by granule–granule and granule–plasma membrane fusions, in general, is not a frequent mechanism found in vivo. On the other hand, PMD, which is characterized by the predominance of nonfused granules exhibiting content losses, and cytolysis, in which eosinophils release their granules after plasma membrane disruption, are much more described in vivo in a variety of eosinophil inflammatory responses/diseases [78,84–87]. PMD in humans is characterized by an increased formation of large, cytoplasmic vesiculotubular carriers termed eosinophil sombrero vesicles (EoSVs), which transport cytokines such as IL-4 and IFN- γ and cationic proteins such as MBP from granules to the extracellular medium [78,84–87].

In the context of the experimental hepatic *S. mansoni* infection in mice, quantitative analyses at the ultrastructural level identified PMD and cytolysis as the predominant secretory processes of eosinophils associated with this disease (Figure 1(D–Diii)) [36]. Classical features of PMD such as an amplified number of large vesicles (analogous to the human EoSVs) and the vesicular transport of MBP were also detected in eosinophils accumulated in the liver of infected animals [36]. Interestingly, in a recent work, we showed that not only the secretory granules but also the mitochondrial dynamics within inflammatory eosinophils respond to the acute *S. mansoni* infection in mice with increased cristae remodeling and inter-organelle contacts [51]. Our TEM analyses captured a significant increase in the numbers and volume of mitochondrial cristae in response to schistosomiasis [51]. Moreover, in this study, we identified an enhanced ability of mitochondria from activated eosinophils to interact with secretory granules, potentially influencing eosinophil immune responses during *S. mansoni* infection [51].

We have also investigated the intestinal biopsies of patients with chronic mild schistosomiasis, the common form of this disease found in endemic regions as a result of repeated exposures. PMD and, mainly, cytolysis were detected, while compound exocytosis was not

observed as a relevant degranulation process occurring *in vivo* within human eosinophils recruited by chronic schistosomiasis [78].

3.5. Eosinophil Interaction with Other Cell Populations

A flow of information among different cells occurs within the boundaries of a *Schistosoma* granuloma, thus defining this structure as a real ecosystem with a diversity of cell populations interacting with each other and with the microenvironment [7,72,88]. Eosinophils constitute a vigorous cell population involved in the establishment and development of the granuloma, in which they form consistent cell–cell interactions [7] (Figure 2). However, considering the complexity of the *Schistosoma* granuloma as an interactive site, most eosinophil interactions are still poorly understood within this structure [7].

The release of IL-5 by CD4+ T lymphocytes, a key cytokine involved in the development and activation of eosinophils, leads to eosinophil recruitment to tissue sites in which granulomas are in the process of formation around parasite eggs [89] (Figure 1B). Once they reach the granuloma, this cell population is settled in an orderly and orchestrated way and is considered to contribute to the responsiveness against the parasite [33,47]. In parallel, eosinophils establish interactions with other cells, enhancing the level of the immune response with both the activation and immunomodulation of the granulomatous process [7,88]. Eosinophils are sources of Th2 cytokines such as IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13 [90]. It is well known that these cells are capable of inducing an increase in the ratio of IL-13 versus IFN- γ , favoring an increase in the numbers of activated macrophages and fibroblasts, which are important cells in the process of tissue remodeling and fibrosis [6,91]. It is also documented that the interaction of eosinophils with macrophages contributes to the establishment and distribution of eosinophils inside the granuloma [91,92].

The interaction between eosinophils and mast cells is also reported within the granuloma [93]. *In vitro* studies suggest that such association helps eosinophils to potentiate the cytotoxic effect against the parasite since, in the absence of eosinophils or mast cells, a significant decrease in antiparasitic response effectiveness was observed [94]. *In vitro* experiments have also indicated a possible neutrophil–eosinophil interaction enhancing schistosomula killing [95]. The interaction with neutrophils increases the secretion of EPO by eosinophils, which potentiates the cytotoxic effect of eosinophil peroxidase [96].

Eosinophils seem to downmodulate monocytes [97]. *In vitro* observations showed that cytokines and chemokines produced by eosinophils could also be responsible for the reduced monocyte cytokine responses documented when monocytes were cultured with autologous eosinophils [97].

The interaction of eosinophils with myofibroblasts is likely involved in the immunoregulation of the inner workings of granulomas [98]. Studies *in vitro* showed that myofibroblasts release CCL11 and IL-5, crucial molecules for the recruitment and accumulation of eosinophils in granulomas. Thus, the interaction between myofibroblasts and eosinophils may promote eosinophil survival in *Schistosoma* granulomas [98]. Tissue eosinophilia is related to wound healing and repair in the intestine, liver, and lungs in several contexts [6]. Eosinophils produce enzymes that are critical for ECM remodeling and wound healing regulators such as resistin-like molecule- α (RELM- α), TGF- α , TGF- β , and fibroblast growth factors, which are associated with increased fibrosis [6,99,100].

Finally, eosinophils potentially interact with plasma cells and hepatocytes in the granuloma context. Eosinophils release some factors such as proliferation-inducing ligand (APRIL) and IL-6, which are responsible for maintaining long-lived plasma cells in the bone marrow [101]. In a situation of liver injury, similar to *Schistosoma*-induced tissue damage, eosinophils release IL-4, which binds to hepatocytes' IL-4R α receptors, thus promoting hepatocyte proliferation and consequent liver regeneration [6,102]. However, eosinophil–plasma cell or eosinophil–hepatocyte interactions have yet to be investigated in the *S. mansoni* granuloma.

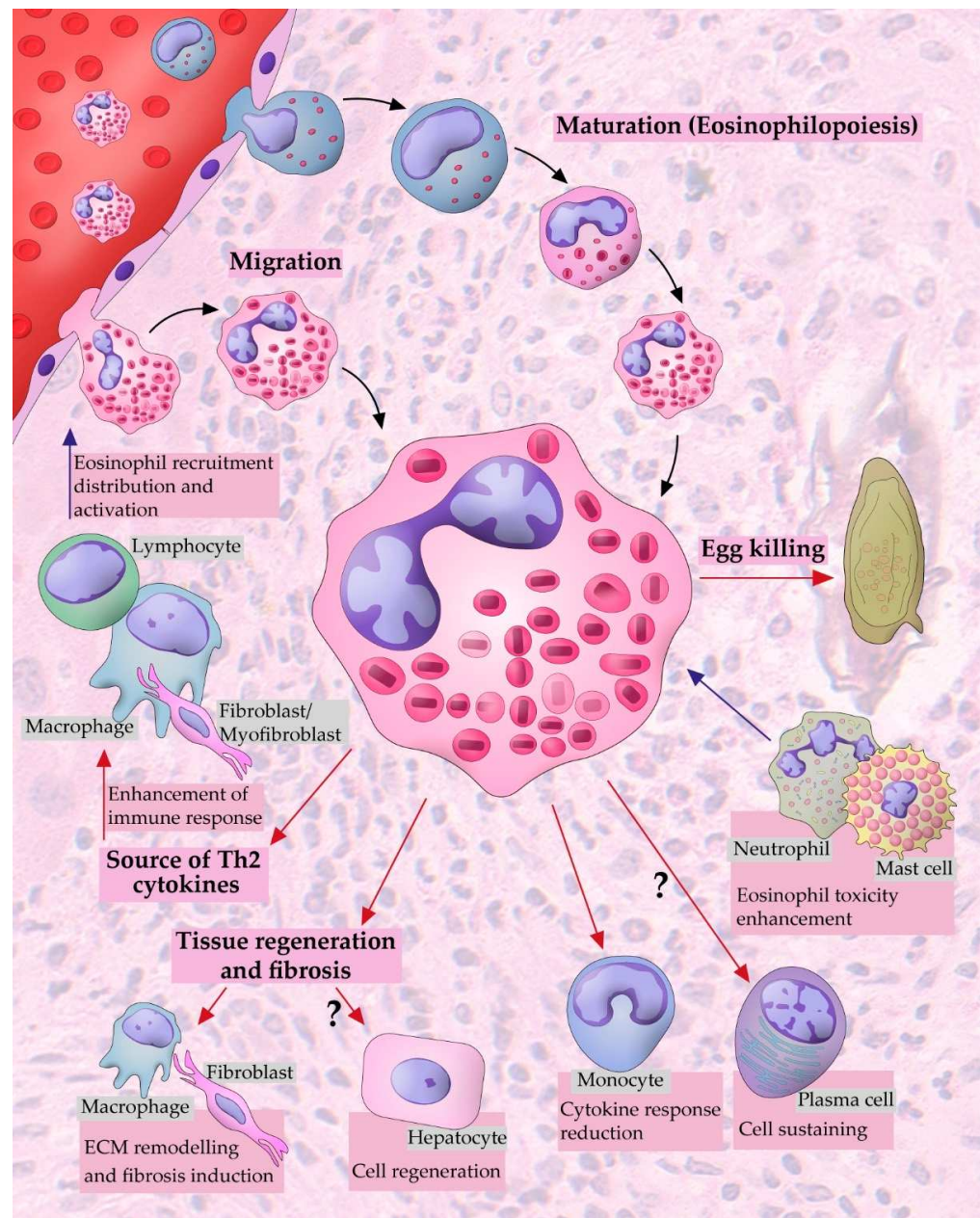


Figure 2. Eosinophil dynamics within a hepatic *Schistosoma mansoni* granuloma. Mature and immature eosinophils are recruited and migrate from the peripheral blood to target tissues, such as the liver. Undifferentiated eosinophils complete their maturation at the granuloma periphery (extramedullary hematopoietic sites). Eosinophils populate the granuloma and potentially interact with both the egg and other cell populations. Eosinophils may have the following possible functional roles and interactions within the granuloma: (i) destruction of the parasite egg through the secretion of cationic proteins [103]; (ii) interaction with neutrophils and mast cells with a resulting increase in the eosinophil toxicity against the parasite egg [94,95]; (iii) plasma cell sustaining; (iv) interaction with monocytes resulting in decreased monocyte responses [97]; (v) induction of hepatocyte proliferation/liver regeneration; (vi) interaction with macrophages and fibroblasts/myofibroblasts, with an impact on the extracellular matrix (ECM) remodeling and fibrosis induction [6,98]; (vii) enhancement of the immune response as a consequence of the eosinophil Th2 cytokines arsenal [90]; and (viii) interaction with lymphocytes, macrophages, and fibroblasts, which favors eosinophil recruitment, distribution, and activation [89,91].

4. Eosinophils in Natural Models of Schistosomiasis

Although humans are the main definitive hosts for *S. mansoni*, some wild vertebrate animals, when in contact with *S. mansoni*-contaminated water, can eventually become naturally infected. For instance, primates, marsupials (skunks), ruminants, and rodents are considered permissive or reservoir hosts for *S. mansoni* [104–107]. These animal models have been used to study the basic biology, immunology, and pathogenesis of schistosomiasis and to explore how *S. mansoni* infects the hosts during the parasite cycle in natural environments. Moreover, because some murine models used in experimental infections have limitations in mimicking human disease [108], wild reservoirs are suggested as suitable biological models [109].

Rodents in Africa and neotropical areas can harbor *S. mansoni* infection [110–112]. In Brazil, the most important models of natural *S. mansoni* infection are the wild semiaquatic rodents, popularly known as water rats from the genera *Nectomys* and *Holochilus* [113,114], especially *H. sciureus* and *N. squamipes* [107,113,115]. Because of their semiaquatic habits, these rodents live in close contact with freshwater collections, an overriding factor for infection with the cercariae of *S. mansoni*. Furthermore, water rats complete the parasite cycle in the environment [115] and have a high tolerance to human presence. As a result, they play an important role in schistosomiasis transmission and epidemiology in endemic areas [107,116].

As noted, the granulomatous response triggered by the *S. mansoni* infection in both experimental models and in humans is characterized by a prominent accumulation of eosinophils around parasite eggs in the target organs (liver and intestines) [29,117]. Wild rodents naturally infected with *S. mansoni* follow the same pattern of eosinophil infiltration with the formation of typical granulomas, as seen in Figure 1A. Histopathological studies of target organs in naturally *Schistosoma*-infected *H. sciurus* and *N. squamipes* describe the initial stages of hepatic granulomas with marked inflammatory infiltrates rich in eosinophils [118–120]. An intense and diffuse infiltration of eosinophils surrounding eggs in the lamina propria of the *H. sciurus* esophagus has also been reported [121]. Costa Silva and colleagues [122] showed that the initial hepatic exudative *Schistosoma* granulomas in naturally infected *N. squamipes* are rich in diffusely distributed eosinophils, with a focal concentration around the eggs. In the same study, the late hepatic exudative granulomas, which had a predominance of large pigmented macrophages, showed a variable number of eosinophils, surrounded or not surrounded by mononuclear cells. This eosinophil distribution in the exudative granuloma was also found in the liver of *Calomys colossus*, another rodent model naturally infected with *S. mansoni* [123].

Previous studies from our group demonstrated that naturally infected *N. squamipes* can be a useful alternative model to help understand eosinophil functions in *S. mansoni* infection. By applying imaging analyses with WSI, we found a significantly lower infiltration of eosinophils in the target organs (liver and intestines) of *N. squamipes* compared to both acute and chronic experimental infection in mice. As noted, while eosinophils in the hepatic granuloma corresponded to 60% of all cells in the acute experimental infection in mice, eosinophils reached only 30% in the natural infection [28].

We showed a remarkably low intensity of the inflammatory response—both granulomatous and non-granulomatous inflammation—when the natural and experimental *S. mansoni* infections were compared. Indeed, it is widely recognized that water rats have a high tolerance to schistosomiasis, presenting a well-balanced relationship with the parasite [115]. These natural models have well-moderated *S. mansoni*-induced pathological features and life-long infections that do not affect their lifespan [124] or their reproductive capacity [125]. If lower eosinophil recruitment is influencing or limiting the severity of the disease in naturally *S. mansoni*-infected *N. squamipes*, it remains unclear.

5. Eosinophils in *Schistosoma mansoni* Infection: Effector or Immunomodulatory Cells?

Historically, eosinophils have been associated with the host's response to helminth infections and with a host-protective and helminthotoxic function. Earlier in vitro studies have indicated an effector role of eosinophils against developmental stages of the *S. mansoni* parasite (schistosomula, pairs of adult worms, and eggs) [65,66,103,126–128]. These cells were considered “helminth killers”, capable of killing even the miracidia larvae inside the *S. mansoni* eggs through the secretion of cationic proteins—mainly, MBP [65,66,103,126–128]. However, the concept that eosinophils act as “defender effector cells” has not been supported by in vivo studies, and the eosinophil roles within the *Schistosoma* granuloma are still under debate (reviewed in [6,7,29,39,117,129]).

More recent studies have been changing the view of eosinophils as cytotoxic effector cells towards a more immunoregulatory role in both adaptive and innate immunity to parasite infections, including *S. mansoni* infection [97,130–132]. Swartz and colleagues [48] investigated the *S. mansoni* infection in two mouse models of eosinophil lineage ablation (Δ dblGATA and TgPHIL). In these models, no eosinophil-dependent differences in granuloma number, size, or fibrosis were observed, as well as no eosinophil-dependent differences in hepatocellular damage. Eosinophil ablation had no effect on worm burden and egg deposition and no impact on the traditional measures of the *S. mansoni* infection [48].

The authors also demonstrated a differential accumulation of mast cells within the granulomas of Δ dblGATA mice, which may compensate for the absence of eosinophils in granulomas [48]. Another study compared the liver immunopathological changes during experimental schistosomiasis in wild-type (WT) BALB/c mice and BALB/c mice selectively deficient in the differentiation of eosinophils (Δ dblGATA) [132]. While eosinophil differentiation had no effect on parasite egg retention in the liver, the authors reported a significant change in the liver immune response and tissue damage, resulting in significantly lower liver concentrations of IL-5, IL-13, IL-33, IL-17, IL-10, and TGF- α and higher concentrations of IFN- γ and TNF- α when compared to (WT) mice [132]. Moreover, the absence of eosinophils resulted in a higher mortality rate in mice infected with a high parasite load. Therefore, these data indicate that eosinophils participate in the establishment and/or amplification of liver Th2 and regulatory responses induced by *S. mansoni*, which is necessary for the balance between liver damage and fibrosis, which in turn is essential for modulating disease severity [132]. As a source of Th2 cytokines, eosinophils have also been shown to play a role in tissue remodeling and repair in murine models of infection by directly driving IL-4-mediated wound repair and regeneration as a post-toxin injury response in the hepatic tissue [102,132].

6. Conclusions

In summary, the dense population of eosinophils triggered by *S. mansoni* infection has been associated with multiple functional roles, including granuloma formation and the protection of the parenchymal tissue [29], the destruction of the entrapped eggs [103], the excretion of the eggs [17,88], remodeling and repair [6,102,133], and immunomodulation [132]. However, there is still a lack of clarity regarding the primary role of eosinophils in the *S. mansoni* infection, likely because their roles have been addressed as an individual population, which does not reflect the whole system (granuloma) in which eosinophils are inserted [7]. Lenzi and collaborators have demonstrated that more than 40,000 cells can populate *Schistosoma* granulomas such as the hepatic granuloma and that internal conditions regulate a robust network of cell–cell and cell–ECM interactions [32,33,72]. As *Schistosoma* granulomas are far more complex than merely structural compartments, studying them as ecological ecosystems with multi-directional interactions would provide a better understanding of eosinophil functions in this context [7]. Furthermore, future studies of eosinophil subpopulations would shed more light on the enigmatic role of these cells in *Schistosoma* granulomas, which is consistent with current concepts of the existence of phenotypically distinct eosinophils in tissues [55,78,134].

Author Contributions: Conceptualization, R.C.N.M., K.K.M. and T.P.S.; Writing—original draft preparation, K.K.M., C.P., V.H.N., Y.A., T.P.S. and R.C.N.M.; Writing—review and editing, K.K.M. and R.C.N.M.; Illustration, V.H.N.; Supervision, R.C.N.M.; Funding acquisition, R.C.N.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil; grants 406019/2021-5 and 309734/2018-5 to R.C.N.M.) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil). V.H.N., C.P., and K.K.M. are fellowship holders from Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES, Brazil). The funders were not involved in the study design; in the collection, analysis, or interpretation of the data; in the writing of the article; or in the decision to submit it for publication.

Acknowledgments: The authors are grateful to Centro de Microscopia (UFMG) for the electron microscopic image acquisition.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations:

Δ dblGATA	Lineage-ablated delta bone marrow progenitors
BALB/C	Albin Laboratory-Mouse
Bregs	Lymphocyte B Regulatory
CCL2	C-C Motif Chemokine Ligand 2
CCL3	C-C Motif Chemokine Ligand 3
CCL4	C-C Motif Chemokine Ligand 4
CCL5	C-C Motif Chemokine Ligand 5
CCL7	C-C Motif Chemokine Ligand 7
CCL11	C-C Motif Chemokine Ligand 11
CCL17	C-C Motif Chemokine Ligand 17
CCL22	C-C Motif Chemokine Ligand 22
CCL24	C-C Motif Chemokine Ligand 24
CCL26	C-C Motif Chemokine Ligand 26
CD11c	Marker for dendritic cells
CD4+ T	Lymphocyte T Cluster of Differentiation 4
ECM	Extracellular Matrix
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EDN	Eosinophil-Derived Neurotoxin
EP	Exudative-Productive stage of granuloma development
EPO	Eosinophil Peroxidase
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin Type 1
IL-2	Interleukin Type 2
IL-4	Interleukin Type 4
IL-5	Interleukin Type 5
IL-6	Interleukin Type 6
IL-10	Interleukin Type 10
IL-12	Interleukin Type 12
IL-13	Interleukin Type 13
IL-17	Interleukin Type 17
IL-33	Interleukin Type 33
IL-4R α	Interleukin Type 4 Receptor-Alpha
IL-5R α	Interleukin 5 Receptor Alpha
IFN- γ	Interferon Gamma
MBP	Major Basic Protein
MIF	Migration inhibitory factor
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9

NE	Necrotic-Exudative stage of granuloma development
P	Productive stage of granuloma development
PE	Pre-Granulomatous Exudative stage of granuloma development
PMD	Piecemeal Degranulation
RELM- α	Resistin-Like Molecule-alpha
SEA	Soluble Egg Antigens
TEM	Transmission Electron Microscopy
TGF- α	Transforming Growth Factor alpha
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TgPHIL	Transgenic mice that lack eosinophils
Th1	Lymphocyte T Helper Type 1
Th2	Lymphocyte T Helper Type 2
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha
Tregs	Lymphocyte T Regulatory
WSI	Whole Slide Image
WT	Wild-Type

References

- Gryseels, B.; Polman, K.; Clerinx, J.; Kestens, L. Human schistosomiasis. *Lancet* **2006**, *368*, 1106–1118. [[CrossRef](#)]
- McManus, D.P.; Dunne, D.W.; Sacko, M.; Utzinger, J.; Vennervald, B.J.; Zhou, X.N. Schistosomiasis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2018**, *4*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Butterworth, A.E. Immunological aspects of human schistosomiasis. *Brit. Med. Bull.* **1998**, *54*, 357–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sher, A.; Coffman, R.L.; Hieny, S.; Scott, P.; Cheever, A.W. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 61–65. [[CrossRef](#)]
- Gazzinelli, G.; Lambertucci, J.R.; Katz, N.; Rocha, R.S.; Lima, M.S.; Colley, D.G. Immune responses during human Schistosomiasis mansoni. XI. Immunologic status of patients with acute infections and after treatment. *J. Immunol.* **1985**, *135*, 2121–2127.
- Ariyaratne, A.; Finney, C.A. Eosinophils and Macrophages within the Th2-Induced Granuloma: Balancing Killing and Healing in a Tight Space. *Infect. Immun.* **2019**, *87*, e00127-19. [[CrossRef](#)]
- Malta, K.K.; Silva, T.P.; Palazzi, C.; Neves, V.H.; Carmo, L.A.S.; Cardoso, S.J.; Melo, R.C.N. Changing our view of the Schistosoma granuloma to an ecological standpoint. *Biol. Rev.* **2021**, *96*, 1404–1420. [[CrossRef](#)]
- Huang, L.; Appleton, J.A. Eosinophils in helminth infection: Defenders and dupes. *Trends Parasitol.* **2016**, *32*, 798–807. [[CrossRef](#)]
- Behm, C.A.; Ovington, K.S. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: Insights from genetically modified mice. *Parasitol. Today* **2000**, *16*, 202–209. [[CrossRef](#)]
- de Jesus, A.R.; Silva, A.; Santana, L.B.; Magalhães, A.; de Jesus, A.A.; de Almeida, R.P.; Rêgo, M.A.; Burattini, M.N.; Pearce, E.J.; Carvalho, E.M. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J. Infect. Dis.* **2002**, *185*, 98–105. [[CrossRef](#)]
- Fallon, P.G.; Smith, P.; Dune, D.W. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. *Eur. J. Immunol.* **1998**, *28*, 1408–1416. [[CrossRef](#)]
- Stadecker, M.J.; Hernandez, H.J. The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: A key role of major egg antigen Sm-p40. *Parasite Immunol.* **1998**, *20*, 217–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jauréguiberry, S.; Paris, L.; Caumes, E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. *Clin. Microbiol. Inf.* **2010**, *16*, 225–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Abdel Aziz, N.; Musaigwa, F.; Mosala, P.; Berkiks, I.; Brombacher, F. Type 2 immunity: A two-edged sword in schistosomiasis immunopathology. *Trends Immunol.* **2022**, *43*, 657–673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Grzych, J.M.; Pearce, E.J.; Cheever, A.W.; Caulada, Z.A.; Caspar, P.; Heiny, S.; Lewis, F.; Sher, A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* **1991**, *146*, 1322–1327. [[PubMed](#)]
- Fallon, P.G. Immunopathology of schistosomiasis: A cautionary tale of mice and men. *Immunol. Today* **2000**, *21*, 29–35. [[CrossRef](#)]
- Schwartz, C.; Fallon, P.G. Schistosoma “Eggs-Itting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2492. [[CrossRef](#)]
- Gobbi, F.; Martelli, G.; Attard, L.; Buonfrate, D.; Angheben, A.; Marchese, V.; Bortesi, L.; Gobbo, M.; Vanino, E.; Viale, P.; et al. *Schistosoma mansoni* Eggs in Spleen and Lungs, Mimicking Other Diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003860. [[CrossRef](#)]
- Lopes De Faria, J. Cor pulmonale in Manson’s schistosomiasis. I. Frequency in necropsy material; pulmonary vascular changes caused by schistosome ova. *Am. J. Pathol.* **1954**, *30*, 167–193.
- Lima, C.W.R.; Oliveira, N.M.C.; Silva, S.V.D.; Duarte, M.E.L.; Barbosa, A.P.F. Ectopic forms of schistosomiasis mansoni in the second macroregion of Alagoas: Case series report and review of the literature. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2017**, *50*, 812–818. [[CrossRef](#)]
- Dastoli, P.A.; Leite, A.L.; da Costa, M.D.S.; Nicácio, J.M.; Pinho, R.S.; Ferrarini, M.A.G.; Cavalheiro, S. Medullary neuroschistosomiasis in adolescence: Case report and literature review. *Childs. Nerv. Syst.* **2021**, *37*, 2735–2741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Artal, F.J.C.; Mesquita, H.M.; de A Gepp, R.; Antunes, J.S.; Kalil, R.K. Brain involvement in a *Schistosoma mansoni* myelopathy patient. *J. Neur. Neurosur. Psych.* **2006**, *77*, 512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. van der Vlugt, L.E.P.M.; Labuda, L.A.; Ozir-Fazalalikhani, A.; Lievers, E.; Gloudemans, A.K.; Liu, K.Y.; Barr, T.A.; Sparwasser, T.; Boon, L.; Ngoa, U.A. Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1dhi B cells: Inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30883. [[CrossRef](#)]
24. van der Vlugt, L.E.P.M.; Zinsou, J.F.; Ozir-Fazalalikhani, A.; Kreamsner, P.G.; Yazdanbakhsh, M.; Adegnik, A.A.; Smits, H.H. Interleukin 10 (IL-10)-producing CD1dhi regulatory B cells from *Schistosoma haematobium*-infected individuals induce IL-10-positive T cells and suppress effector T-cell cytokines. *J. Infect. Dis.* **2014**, *210*, 1207–1216. [[CrossRef](#)]
25. Turner, J.D.; Jenkins, G.R.; Hogg, K.G.; Aynsley, S.A.; Paveley, R.A.; Cook, P.C.; Coles, M.C.; Mountford, A.P. CD4+ CD25+ regulatory cells contribute to the regulation of colonic Th2 granulomatous pathology caused by schistosome infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1269. [[CrossRef](#)]
26. Hesse, M.; Piccirillo, C.A.; Belkaid, Y.; Pruffer, J.; Mentink-Kane, M.; Leusink, M.; Cheever, A.W.; Shevach, E.M.; Wynn, T.A. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 3157–3166. [[CrossRef](#)]
27. Chuah, C.; Jones, M.K.; Burke, M.L.; McManus, D.P.; Gobert, G.N. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends Parasitol.* **2014**, *30*, 141–150. [[CrossRef](#)]
28. Amaral, K.B.; Silva, T.P.; Dias, F.F.; Malta, K.K.; Rosa, F.M.; Costa-Neto, S.F.; Gentile, R.; Melo, R.C.N. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184696. [[CrossRef](#)]
29. Hams, E.; Aviello, G.; Fallon, P.G. The schistosoma granuloma: Friend or foe? *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 89. [[CrossRef](#)]
30. Pagán, A.J.; Ramakrishnan, L. The formation and function of granulomas. *Annu. Rev. Immunol.* **2018**, *36*, 639–665. [[CrossRef](#)]
31. Llanwarne, F.; Helmsby, H. Granuloma formation and tissue pathology in *Schistosoma japonicum* versus *Schistosoma mansoni* infections. *Parasite Immunol.* **2021**, *43*, e12778. [[CrossRef](#)]
32. Lenzi, H.L.; Kimmel, E.; Schechtman, H.; Pelajo-Machado, M.; Romanha, W.S.; Pacheco, R.G.; Mariano, M.; Lenzi, J.A. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: Morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1998**, *93*, 141–151. [[CrossRef](#)]
33. Lenzi, H.L.; Romanha, W.S.; Santos, R.M.; Rosas, A.; Mota, E.M.; Manso, P.P.A.; Caputo, L.F.G.; Pelajo-Machado, M. Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: Fractal arrangement, internal regulation, autopoietic component and closure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2006**, *101*, 219–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Richter, J.; Correia Dacal, A.R.; Vergetti Siqueira, J.G.; Poggensee, G.; Mannsmann, U.; Deelder, A.; Feldmeier, H. Sonographic prediction of variceal bleeding in patients with liver fibrosis due to *Schistosoma mansoni*. *Trop. Med. Inter. Health* **1998**, *3*, 728–735. [[CrossRef](#)]
35. Andrade, Z.A. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol.* **2009**, *31*, 656–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Dias, F.F.; Amaral, K.B.; Malta, K.K.; Silva, T.P.; Rodrigues, G.S.C.; Rosa, F.M.; Rodrigues, G.O.L.; Costa, V.V.; Chiarini-Garcia, H.; Weller, P.F.; et al. Identification of piecemeal degranulation and vesicular transport of MBP-1 in liver-infiltrating mouse eosinophils during acute experimental *Schistosoma mansoni* infection. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 3019. [[CrossRef](#)]
37. Caldas, I.R.; Campi-Azevedo, A.C.; Oliveira, L.F.A.; Silveira, A.M.S.; Oliveira, R.C.; Gazzinelli, G. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop.* **2008**, *108*, 109–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lambertucci, J.R. Acute schistosomiasis mansoni: Revisited and reconsidered. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 422–435. [[CrossRef](#)]
39. Mitre, E.; Klion, A.D. Eosinophils and helminth infection: Protective or pathogenic? Springer Berlin Heidelberg. *Seminars Immunopathol.* **2021**, *43*, 363–381. [[CrossRef](#)]
40. Mahmoud, A.A.F.; Warren, K.S.; Graham Jr, R.C. Antieosinophil serum and the kinetics of eosinophilia in Schistosomiasis mansoni. *J. Exp. Med.* **1975**, *142*, 560–574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Knopf, P.M. *Schistosoma mansoni*: Peripheral and tissue eosinophilia in infected rats. *Exp. Parasitol.* **1979**, *47*, 232–245. [[CrossRef](#)]
42. Coffman, R.L.; Seymour, B.W.P.; Hudak, S.; Jackson, J.; Rennick, D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* **1989**, *245*, 308–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dent, L.A.; Strath, M.; Mellor, A.L.; Sanderson, C.J. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J. Exp. Med.* **1990**, *172*, 1425–1431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kopf, M.; Brombacher, F.; Hodgkin, P.D.; Ramsay, A.J.; Milbourne, E.A.; Dai, W.J.; Ovington, K.S.; Behm, C.A.; Köhler, G.; Young, I.G. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* **1996**, *4*, 15–24. [[CrossRef](#)]
45. Mahmoud, A.A.F. The ecology of eosinophils in schistosomiasis. *J. Infect. Dis.* **1982**, *145*, 613–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Borojovic, R.; Stocker, S.; Grimaud, J.A. Hepatic eosinophil granulocytopenia in murine experimental Schistosomiasis mansoni. *Brit. J. Exp. Pathol.* **1981**, *62*, 480.
47. Lenzi, H.L.; Pacheco, R.G.; Pelajo-Machado, M.; Panasco, M.S.; Romanha, W.S.; Lenzi, J.A. Immunological system and *Schistosoma mansoni*: Co-evolutionary immunobiology. What is the eosinophil role in parasite-host relationship? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1997**, *92*, 19–32. [[CrossRef](#)]

48. Swartz, J.M.; Dyer, K.D.; Cheever, A.W.; Ramalingam, T.; Pesnicak, L.; Domachowske, J.B.; Lee, J.J.; Lee, N.A.; Foster, P.S.; Wynn, T.A. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood* **2006**, *108*, 2420–2427. [[CrossRef](#)]
49. Costain, A.H.; Phythian-Adams, A.T.; Colombo, S.A.P.; Marley, A.K.; Owusu, C.; Cook, P.C.; Brown, S.L.; Webb, L.M.; Lundie, R.J.; Smits, H.H. Dynamics of host immune response development during *Schistosoma mansoni* infection. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 906338. [[CrossRef](#)]
50. Dyer, K.D.; Moser, J.M.; Czapiga, M.; Siegel, S.J.; Percopo, C.M.; Rosenberg, H.F. Functionally competent eosinophils differentiated ex vivo in high purity from normal mouse bone marrow. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 4004–4009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Bonjour, K.; Palazzi, C.; Silva, T.P.; Malta, K.K.; Neves, V.H.; Oliveira-Barros, E.G.; Neves, I.; Kersten, V.A.; Fortuna, B.T.; Samarasinghe, A.E.; et al. Mitochondrial Population in Mouse Eosinophils: Ultrastructural Dynamics in Cell Differentiation and Inflammatory Diseases. *Front. Cell Dev. Bio.* **2022**, *10*, 836755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Tamarozzi, F.; Ursini, T.; Hoekstra, P.T.; Silva, R.; Costa, C.; Gobbi, F.; Monteiro, G.B.; Motta, L.; van Dam, G.J.; Corstjens, P.L.; et al. Evaluation of microscopy, serology, circulating anodic antigen (CAA), and eosinophil counts for the follow-up of migrants with chronic schistosomiasis: A prospective cohort study. *Parasit. Vectors* **2021**, *14*, 149. [[CrossRef](#)]
53. Paran, Y.; Ben-Ami, R.; Orlev, B.; Halutz, O.; Elalouf, O.; Wasserman, A.; Zimmerman, O.; Nahmani, I.; Rabinowich, L.; Finn, T. Chronic schistosomiasis in African immigrants in Israel: Lessons for the non-endemic setting. *Medicine* **2019**, *98*, e18481. [[CrossRef](#)]
54. Moore, D.L.; Grove, D.I.; Warren, K.S. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: Quantitation of cell populations. *J. Pathol.* **1977**, *121*, 41–50. [[CrossRef](#)]
55. Melo, R.C.N.; Dvorak, A.M.; Weller, P.F. Eosinophil-associated diseases (EADs). In *Eosinophil Ultrastructure: Atlas of Eosinophil Cell Biology and Pathology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2022; pp. 289–394.
56. Kephart, G.M.; Andrade, Z.A.; Gleich, G.J. Localization of eosinophil major basic protein onto eggs of *Schistosoma mansoni* in human pathologic tissue. *Am. J. Pathol.* **1988**, *133*, 389. [[PubMed](#)]
57. Thorne, K.J.; Mazza, G. Eosinophilia, activated eosinophils and human schistosomiasis. *J. Cell. Sci.* **1991**. [[CrossRef](#)]
58. Hussein, M.R. Mucocutaneous Splendore-Hoeppli phenomenon. *J. Cutane. Pathol.* **2008**, *35*, 979–988. [[CrossRef](#)]
59. White, J.R.; Imburgia, C.; Dul, E.; Appelbaum, E.; O'Donnell, K.; O'Shannessy, D.J.; Brawner, M.; Fornwald, J.; Adamou, J.; Elshourbagy, N.A. Cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine that binds to the CCR3 receptor and activates human eosinophils. *J. Leukoc. Biol.* **1997**, *62*, 667–675. [[CrossRef](#)]
60. Souza, P.R.S.; Souza, A.L.S.; Negrao-Correa, D.; Teixeira, A.L.; Teixeira, M.M. The role of chemokines in controlling granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni* infection. *Acta Tropi.* **2008**, *108*, 135–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Jakubzick, C.; Wen, H.; Matsukawa, A.; Keller, M.; Kunkel, S.L.; Hogaboam, C.M. Role of CCR4 ligands, CCL17 and CCL22, during *Schistosoma mansoni* egg-induced pulmonary granuloma formation in mice. *Am. J. Pathol.* **2004**, *165*, 1211–1221. [[CrossRef](#)]
62. Sousa-Pereira, S.R.; Teixeira, A.L.; Silva, L.C.S.; Souza, A.L.S.; Antunes, C.M.; Teixeira, M.M.; Lambertucci, J.R. Serum and cerebral spinal fluid levels of chemokines and Th2 cytokines in *Schistosoma mansoni* myeloradiculopathy. *Parasite Immunol.* **2006**, *28*, 473–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Silveira-Lemos, D.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins-Filho, O.A.; Souza-Soares, A.L.; Castro-Silva, P.; Costa-Silva, M.F.; Guimarães, P.H.G.; Ferraz, H.B.; Oliveira-Fraga, L.A.; Teixeira, M.M. Seric chemokines and chemokine receptors in eosinophils during acute human schistosomiasis mansoni. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 380–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Weller, P.F.; Spencer, L.A. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 746–760. [[CrossRef](#)]
65. Capron, M.; Torpier, G.; Capron, A. In vitro killing of *S. mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: Role of cytophilic antibodies. *J. Immunol.* **1979**, *123*, 2220–2230.
66. Butterworth, A.E.; Vadas, M.A.; Wassom, D.L.; Dessein, A.; Hogan, M.; Sherry, B.; Gleich, G.J. Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence. *J. Exp. Med.* **1979**, *150*, 1456–1471. [[CrossRef](#)]
67. Adachi, T.; Alam, R. The mechanism of IL-5 signal transduction. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **1998**, *275*, C623–C633. [[CrossRef](#)]
68. Teixeira, M.M.; Talvani, A.; Tafuri, W.L.; Lukacs, N.W.; Hellewell, P.G. Eosinophil recruitment into sites of delayed-type hypersensitivity reactions in mice. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *69*, 353–360. [[CrossRef](#)]
69. Shin, M.H.; Lee, Y.A.; Min, D.-Y. Eosinophil-mediated tissue inflammatory responses in helminth infection. *Kor. J. Parasitol.* **2009**, *47*, S125. [[CrossRef](#)]
70. Yi, S.; Zhai, J.; Niu, R.; Zhu, G.; Wang, M.; Liu, J.; Huang, H.; Wang, Y.; Jing, X.; Kang, L. Eosinophil recruitment is dynamically regulated by interplay among lung dendritic cell subsets after allergen challenge. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3879. [[CrossRef](#)]
71. Lins, R.A.B.; Chaves, M.E.C.; de Melo-Júnior, M.R.; Araújo-Filho, J.L.S.; de Lima Cavalcanti, C.B. A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2008**, *41*, 173–178. [[CrossRef](#)]
72. Lenzi, H.L.; Romanha, W.S.; Pelajo-Machado, M.; Mota, E.M.; Lenzi, J.A. Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico. In *Schistosoma Mansoni & Esquistossomose: Uma Visão Multidisciplinária*; Carvalho, O.S., Coelho, P.M.Z., Lenzi, H., Eds.; L. Fiocruz: Rio de Janeiro, Brazil, 2008; pp. 569–654.
73. Geuskens, M.; Borojevic, R.; Van Gansen, P. Eosinophil granulocytopenia in hepatic periportal granulomas during the chronic phase of experimental murine *Schistosomiasis mansoni*. *Biol. Cell* **1991**, *71*, 89–96. [[CrossRef](#)]

74. Lenzi, H.L.; Lenzi, J.A.; Rosman, F.C.; Pelajo-Machado, M.; Mota, E.M.; Panasco, M.S.; Oliveira, D.N. Extramedullary hematopoiesis in murine schistosomiasis mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1995**, *90*, 169–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Francisco, J.S.; Terra, M.A.B.L.; Klein, G.C.T.; Dias de Oliveira, B.C.E.P.; Pelajo Machado, M. The Hepatic Extramedullary Hematopoiesis during Experimental Murine Schistosomiasis. *Front. Immunol.* **2022**, 4861. [[CrossRef](#)]
76. Dutra, H.S.; Rossi, M.I.D.; Azevedo, S.P.; El-Cheikh, M.C.; Borojevic, R. Haematopoietic capacity of colony-forming cells mobilized in hepatic inflammatory reactions as compared to that of normal bone marrow cells. *Res. Immunol.* **1997**, *148*, 437–444. [[CrossRef](#)]
77. Rossi, M.I.D.; Dutra, H.S.; El-Cheikh, M.C.; Bonomo, A.; Borojevic, R. Extramedullary B lymphopoiesis in liver schistosomal granulomas: Presence of the early stages and inhibition of the full B cell differentiation. *Int. Immunol.* **1999**, *11*, 509–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Melo, R.C.N.; Dvorak, A.M.; Weller, P.F. *Eosinophil Ultrastructure: Atlas of Eosinophil Cell Biology and Pathology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2022; p. 518.
79. Lukacs, N.W.; Kunkel, S.L.; Strieter, R.M.; Warmington, K.; Chensue, S.W. The role of macrophage inflammatory protein 1 alpha in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *J. Exp. Med.* **1993**, *177*, 1551–1559. [[CrossRef](#)]
80. Souza, A.L.S.; Roffê, E.; Pinho, V.; Souza, D.G.; Silva, A.F.; Russo, R.C.; Guabiraba, R.; Pereira, C.A.J.; Carvalho, F.M.; Barsante, M.M. Potential role of the chemokine macrophage inflammatory protein 1 α in human and experimental schistosomiasis. *Inf. Immunity* **2005**, *73*, 2515–2523. [[CrossRef](#)]
81. Magalhaes, E.S.; Paiva, C.N.; Souza, H.S.P.; Pyrrho, A.S.; Mourao-Sá, D.; Figueiredo, R.T.; Vieira-de-Abreu, A.; Dutra, H.S.; Silveira, M.S.; Gaspar-Elsas, M.I.C. Macrophage migration inhibitory factor is critical to interleukin-5-driven eosinophilopoiesis and tissue eosinophilia triggered by *Schistosoma mansoni* infection. *FASEB J.* **2009**, *23*, 1262–1271. [[CrossRef](#)]
82. da Paz, V.R.F.; Figueiredo-Vanzan, D.; dos Santos Pyrrho, A. Interaction and involvement of cellular adhesion molecules in the pathogenesis of Schistosomiasis mansoni. *Immunol. Lett.* **2019**, *206*, 11–18. [[CrossRef](#)]
83. Spencer, L.A.; Bonjour, K.; Melo, R.C.N.; Weller, P.F. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 496. [[CrossRef](#)]
84. Melo, R.C.N.; Weller, P.F. Piecemeal degranulation in human eosinophils: A distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histo. Histopathol.* **2010**, *25*, 1341. [[CrossRef](#)]
85. Melo, R.C.N.; Weller, P.F. Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. *J. Leukoc. Biol.* **2018**, *104*, 85–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Melo, R.C.N.; Spencer, L.A.; Dvorak, A.M.; Weller, P.F. Mechanisms of eosinophil secretion: Large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *J. Leukoc. Biol.* **2008**, *83*, 229–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Melo, R.C.N.; Weller, P.F. Vesicular trafficking of immune mediators in human eosinophils revealed by immunoelectron microscopy. *Exp. Cell. Res.* **2016**, *347*, 385–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Lenzi, H.L.; Lenzi, J.A.; Sobral, A.C.L. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. *Braz. J. Med.* **1987**, *20*, 433–435.
89. Metwali, A.; Elliott, D.; Blum, A.M.; Weinstock, J.V. Granuloma eosinophils enhance IL-5 production by lymphocytes from mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **1993**, *151*, 7048–7056.
90. Rumbley, C.A.; Sugaya, H.; Zekavat, S.A.; El Refaei, M.; Perrin, P.J.; Phillips, S.M. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 1003–1009.
91. Souza, C.O.S.; Gardinassi, L.G.; Rodrigues, V.; Faccioli, L.H. Monocyte and macrophage-mediated pathology and protective immunity during schistosomiasis. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1973. [[CrossRef](#)]
92. Reiman, R.M.; Thompson, R.W.; Feng, C.G.; Hari, D.; Knight, R.; Cheever, A.W.; Rosenberg, H.F.; Wynn, T.A. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 1471–1479. [[CrossRef](#)]
93. Lenzi, H.L.; Sobral, A.C.L.; Lenzi, J.A. In vivo kinetics of eosinophils and mast cells in experimental murine schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1987**, *82*, 67–76. [[CrossRef](#)]
94. Capron, M.; Rousseaux, J.; Mazingue, C.; Bazin, H.; Carpon, A. Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody-dependent eosinophil cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *J. Immunol.* **1978**, *121*, 2518–2525. [[PubMed](#)]
95. Capron, M.; Capron, A. Schistosomes and eosinophils. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hygie.* **1980**, *74*, 44–50. [[CrossRef](#)]
96. Sanches, R.C.O.; Mambelli, F.; Oliveira, S.C. Neutrophils and schistosomiasis: A missing piece in pathology. *Parasite Immunol.* **2022**, *44*, e12916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Tweyongyere, R.; Namanya, H.; Naniima, P.; Cose, S.; Tukahebwa, E.M.; Elliott, A.M.; Dunne, D.W.; Wilson, S. Human eosinophils modulate peripheral blood mononuclear cell response to *Schistosoma mansoni* adult worm antigen *in vitro*. *Parasite Immunol.* **2016**, *38*, 516–522. [[CrossRef](#)]
98. Paiva, L.A.; Brand, C.; Bandeira-Melo, C.; Bozza, P.T.; El-Cheikh, M.C.; Silva, P.M.; Borojevic, R.; Perez, S.A.C. Hepatic myofibroblasts derived from *Schistosoma mansoni*-infected mice are a source of IL-5 and eotaxin: Controls of eosinophil populations *in vitro*. *Parasite Vectors* **2015**, *8*, 577. [[CrossRef](#)]
99. Turner, J.-E.; Morrison, P.J.; Wilhelm, C.; Wilson, M.; Ahlfors, H.; Renauld, J.-C.; Panzer, U.; Helmby, H.; Stockinger, B. IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 2951–2965. [[CrossRef](#)]
100. Shamri, R.; Xenakis, J.J.; Spencer, L.A. Eosinophils in innate immunity: An evolving story. *Cell Tissue Res.* **2011**, *343*, 57–83. [[CrossRef](#)]

101. Chu, V.T.; Fröhlich, A.; Steinhauser, G.; Scheel, T.; Roch, T.; Fillatreau, S.; Lee, J.J.; Löhning, M.; Berek, C. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 151–159. [[CrossRef](#)]
102. Goh, Y.P.S.; Henderson, N.C.; Heredia, J.E.; Red Eagle, A.; Odegaard, J.I.; Lehwald, N.; Nguyen, K.D.; Sheppard, D.; Mukundan, L.; Locksley, R.M. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 9914–9919. [[CrossRef](#)]
103. James, S.L.; Colley, D.G. Eosinophil-mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Reticulo. Soc.* **1976**, *20*, 359–374.
104. Duplantier, J.-M.; Sene, M. Rodents as reservoir hosts in the transmission of *Schistosoma mansoni* in Richard-Toll, Senegal, West Africa. *J. Helminthol.* **2000**, *74*, 129–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Catalano, S.; Sène, M.; Diouf, N.D.; Fall, C.B.; Borlase, A.; Léger, E.; Bâ, K.; Webster, J.P. Rodents as natural hosts of zoonotic *Schistosoma* species and hybrids: An epidemiological and evolutionary perspective from West Africa. *J. Infect. Dis.* **2018**, *218*, 429–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Richards, L.; Erko, B.; Ponpetch, K.; Ryan, S.J.; Liang, S. Assessing the nonhuman primate reservoir of *Schistosoma mansoni* in Africa: A systematic review. *Infect. Dis. Pov.* **2019**, *8*, 10–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Rey, L. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis transmission in Brazil. *Res. Rev. Parasitol.* **1993**, *53*, 13–25.
108. Wilson, R.A.; Li, X.-H.; Castro-Borges, W. Do schistosome vaccine trials in mice have an intrinsic flaw that generates spurious protection data? *Parasite Vectors* **2016**, *9*, 89. [[CrossRef](#)]
109. Bastos, O.d.C.; Sadigursky, M.; Nascimento, M.d.D.S.B.d.; Brazil, R.P.; Holanda, J.C. *Holochilus brasiliensis* nanus Thomas, 1897: As an experimental model for filariasis, leishmaniasis and schistosomiasis. *Rev. Inst. Med. Trop.* **1984**, *26*, 307–315. [[CrossRef](#)]
110. Duplantier, J.-M.; Sene, M. Rodents as definitive hosts of *Schistosoma*, with special reference to *S. mansoni* transmission. In *Micromammals and Macroparasites*; Morand, S., Krasnov, B.R., Poulin, R., Eds.; Springer: Tokyo, Japan, 2006; pp. 527–543.
111. Théron, A.; Pointier, J.P.; Morand, S.; Imbert-Establet, D.; Borel, G. Long-term dynamics of natural populations of *Schistosoma mansoni* among *Rattus rattus* in patchy environment. *Parasitology* **1992**, *104*, 291–298. [[CrossRef](#)]
112. de Noya, B.A.; Pointier, J.; Colmenares, C.; Théron, A.; Balzan, C.; Cesari, I.; González, S.; Noya, O. Natural *Schistosoma mansoni* infection in wild rats from Guadeloupe: Parasitological and immunological aspects. *Acta Tropi.* **1997**, *68*, 11–21. [[CrossRef](#)]
113. Miranda, G.S.; Miranda, B.S.; Rodrigues, J.G.M.; Lira, M.G.S.; Nogueira, R.A.; Viegas-Melo, D.; Silva-Souza, N. Research Note. The wild water-rats and their relevance in the context of schistosomiasis mansoni in Brazil: What we know and recommendations for further research. *Helminthologia* **2017**, *54*, 165–169. [[CrossRef](#)]
114. Picot, H. *Holochilus brasiliensis* and *Nectomys squamipes* (Rodentia-Cricetidae) natural hosts of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1992**, *87*, 255–260. [[CrossRef](#)]
115. Gentile, R.; Soares, M.S.; Barreto, M.G.M.; Gonçalves, M.M.L.; D’Andrea, P.S. The Role of Wild Rodents in the Transmission of *Schistosoma mansoni* in Brazil. In *Schistosomiasis*; Rokni, M.B., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2012; pp. 231–254.
116. do Carmo-Silva, C.F.; Teles-Reis, A.; Silva-Soares, R.F.; Rodrigues, J.G.M.; Lira, M.G.S.; Nogueira, R.A.; Viegas-Melo, D.; Cardoso, D.T.; Miranda, G.S.; Silva-Souza, N. Spatial and seasonal distribution of *Holochilus sciureus* with *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area for schistosomiasis in Brazil. *Acta Parasit.* **2019**, *64*, 932–937. [[CrossRef](#)]
117. Abdala-Valencia, H.; Coden, M.E.; Chiarella, S.E.; Jacobsen, E.A.; Bochner, B.S.; Lee, J.J.; Berdnikovs, S. Shaping eosinophil identity in the tissue contexts of development, homeostasis, and disease. *J. Leukoc. Biol.* **2018**, *104*, 95–108. [[CrossRef](#)]
118. Rodrigues, J.G.M.; Lira, M.G.S.; Nogueira, R.A.; Gomes, G.C.C.; Licá, I.C.L.; Silva, J.K.A.d.O.; Miranda, G.S.; Silva-Souza, N. Alterations in blood glucose concentration in wild rodents, *Holochilus sciureus*, naturally infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Braz. Parasitol. Vet.* **2022**, *31*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Miranda, G.S.; Rodrigues, J.G.M.; Lira, M.G.S.; Nogueira, R.A.; Gomes, G.C.C.; Silva-Souza, N. *Schistosoma mansoni* infection in *Holochilus sciureus* shows sex-related differences in parasitological patterns. *Open J. Anim. Sci.* **2019**, *9*, 173. [[CrossRef](#)]
120. Costa Neto, S.F.d.; Alves, V.M.T.; Alves, V.M.T.; Garcia, J.S.; Santos, M.A.J.d.; Nogueira, V.d.A.; Brito, M.d.F.; Gentile, R.; Pinheiro, J. Biochemical and histological changes in liver of *Nectomys squamipes* naturally infected by *Schistosoma mansoni*. *Rev. Braz. Parasitol. Vet.* **2013**, *22*, 519–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Silva-Souza, N.d.; Silva, A.P.d.C.d.; Oliveira, R.M.d.; Lira, M.G.S.; Nogueira, R.A.; Penha-Silva, T.A.d.; Melo, S.d.A.; Andrade, F.H.E.d.; Santos-Ribeiro, L.S.d.; Carvalho, A.V.d. Parasitological and histological aspects of *Holochilus sciureus* naturally infected by *Schistosoma mansoni*. *Rev. Braz. Parasitol. Vet.* **2019**, *28*, 769–772. [[CrossRef](#)]
122. Costa-Silva, M.; Rodrigues-Silva, R.; Hulstijn, M.; Neves, R.H.; Panasco, M.d.S.; Lenzi, H.L.; Machado-Silva, J.R. Natural *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes*: Histopathological and morphometric analysis in comparison to experimentally infected *N. squamipes* and C3H/He mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 129–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Lenzi, J.A.; Mota, E.M.; Machado, M.P.; Paiva, R.A.; Lenzi, H.L. *Calomys callosus*: An alternative model to study fibrosis in *Schistosomiasis mansoni*: The pathology of the acute phase. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1995**, *90*, 311–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Silva, R.R.; Silva, J.R.M.; Faerstein, N.F.; Lenzi, H.L.; Rey, L. Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni* parasitological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1992**, *87*, 271–276. [[CrossRef](#)]
125. D’andrea, P.S.; Fernandes, F.A.; Cerqueira, R.; Rey, L. Experimental evidence and ecological perspectives for the adaptation of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Digenea: Schistosomatidae) to a wild host, the water-rat, *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (Rodentia: Sigmodontinae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 11–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

126. Hsü, S.L.; Hsü, H.F.; Mitros, F.A.; Helms, C.M.; Solomon, R.I. Eosinophils as effector cells in the destruction of *Schistosoma mansoni* eggs in granulomas. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1980**, *74*, 179–183. [[CrossRef](#)]
127. Khalife, J.; Dunne, D.W.; Richardson, B.A.; Mazza, G.; Thorne, K.J.; Capron, A.; Butterworth, A.E. Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **1989**, *142*, 4422–4427. [[PubMed](#)]
128. Ramalho-Pinto, F.J.; McLaren, D.J.; Smithers, S.R. Complement-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils *in vitro*. *J. Exp. Med.* **1978**, *147*, 147–156. [[CrossRef](#)]
129. Klion, A.D.; Ackerman, S.J.; Bochner, B.S. Contributions of eosinophils to human health and disease. *Ann. Rev. Pathol.* **2020**, *15*, 179. [[CrossRef](#)]
130. Jacobsen, E.A.; Taranova, A.G.; Lee, N.A.; Lee, J.J. Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J. All. Clin. Immunol.* **2007**, *119*, 1313–1320. [[CrossRef](#)]
131. Rosenberg, H.F.; Dyer, K.D.; Foster, P.S. Eosinophils: Changing perspectives in health and disease. *Nat. Rev.* **2013**, *13*, 9. [[CrossRef](#)]
132. de Oliveira, V.G.; Rodrigues, V.F.; Moreira, J.M.P.; Rodrigues, J.L.; Maggi, L.; Resende, S.D.; Negrão-Corrêa, D. Eosinophils participate in modulation of liver immune response and tissue damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Cytokine* **2022**, *149*, 155701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Coakley, G.; Wright, M.D.; Borger, J.G. *Schistosoma mansoni*-derived lipids in extracellular vesicles: Potential agonists for eosinophilic tissue repair. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1010. [[CrossRef](#)]
134. Masterson, J.C.; Menard-Katcher, C.; Larsen, L.D.; Furuta, G.T.; Spencer, L.A. Heterogeneity of intestinal tissue eosinophils: Potential considerations for next-generation eosinophil-targeting strategies. *Cells* **2021**, *10*, 426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6 CAPÍTULO 3

Aspectos descritivos espaço-temporais da comunidade celular dos granulomas intestinais e hepáticos durante a esquistossomose mansoni experimental

Com uma abordagem ecológica, investigamos aspectos da composição e estrutura da comunidade celular de granulomas intestinais e hepáticos assim como o desenvolvimento espaço-temporal dos mesmos durante a infecção experimental por *S. mansoni*. Com a aplicação da técnica WSI (*Whole Slide Imaging*), realizamos um estudo detalhado e comparativo acerca da composição espaço-temporal da comunidade celular dos granulomas do fígado e intestino grosso. Para isso, foram utilizadas estratégias metodológicas tanto qualitativas como quantitativas que permitiram caracterizar a comunidade celular do granuloma hepático e intestinal.

Parâmetros ecológicos clássicos foram utilizados para descrever a comunidade celular dos granulomas, como a abundância e a densidade, além de aspectos da diversidade. Adicionalmente, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), foram descritos potenciais interações entre as populações do granuloma. Em conjunto, nossos dados revelaram que a dinâmica de formação de granulomas intestinais e hepáticos são bastante diferentes e independentes. A riqueza encontrada nos granulomas intestinais e hepáticos foi a mesma durante o processo de formação espaço-temporal dos granulomas. No entanto, nossos dados revelaram que a abundância das populações celulares flutuou ao longo do tempo. Granulomas intestinais apresentam maiores diversidades que granulomas hepáticos. Além disso, granulomas de estágios evolutivos diferentes do mesmo órgão-alvo são mais similares que granulomas de mesmo estágio evolutivo de diferentes órgãos. Interessantemente, identificamos pela primeira vez robusta interação celular entre as populações de eosinófilos e plasmócitos, conforme revelado pelo estudo ultraestrutural. Tal interação pode ter importante significado funcional na manutenção de plasmócitos localmente, conforme demonstrado em outros contextos de doenças (CHU; BEREK, 2012; CHU; FRÖHLICH; STEINHAUSER; SCHEEL *et al.*, 2011). No caso, uma população celular comum (eosinófilo) atua na manutenção/ação de uma população rara (plasmócito). O melhor entendimento do granuloma esquistossomótico como um ecossistema pode ser a chave para entender a complexidade dessa resposta e apontar novos alvos terapêuticos.

7 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária causada pelo trematódeo difenético do gênero *Schistosoma*, especialmente o *Schistosoma mansoni*. A esquistossomose mansoni constitui um grave problema de saúde pública e é considerada uma doença tropical negligenciada de grande importância clínica e socioeconômica. 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 (GRYSEELS; POLMAN; CLERINX; KESTENS, 2006; MCMANUS; BERGQUIST; CAI; RANASINGHE *et al.*, 2020; MCMANUS; DUNNE; SACKO; UTZINGER *et al.*, 2018; WHO, 2011). Os parasitos adultos têm como habitat os pequenos vasos sanguíneos mesentéricos inferiores que circundam o cólon e o ceco intestinais do hospedeiro vertebrado. Os ovos postos pelas fêmeas do parasito são depositados no revestimento endotelial das paredes dos vasos sanguíneos capilares e disseminados através do fluxo sanguíneo para outros órgãos, principalmente o fígado ou são translocados através do epitélio intestinal para o lúmen intestinal (GRYSEELS; POLMAN; CLERINX; KESTENS, 2006; MCMANUS; BERGQUIST; CAI; RANASINGHE *et al.*, 2020; SCHWARTZ; FALLON, 2018). Os ovos são metabolicamente ativos e altamente antigênicos sendo capazes de produzir uma grande resposta inflamatória necessária para translocação dos ovos pela lâmina própria até o lúmen intestinal e de volta ao meio ambiente (SCHWARTZ; FALLON, 2018). A patologia da esquistossomose mansônica, resulta dos ovos do parasito que permanecem presos nos tecidos do hospedeiro, particularmente no fígado e nos intestinos.

A esquistossomose apresenta uma característica histopatológica marcante que define a doença: a formação de granulomas ao redor dos ovos do parasito em órgãos-alvo de hospedeiros vertebrados. Os granulomas são agregados bem circunscritos compostos de vários tipos de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, linfócitos e macrófagos, inseridos em uma matriz extracelular rica em colágeno (CHUAH; JONES; BURKE; MCMANUS *et al.*, 2014; LENZI; KIMMEL; SCHECHTMAN; PELAJO-MACHADO *et al.*, 1998; LENZI; ROMANHA; SANTOS; ROSAS *et al.*, 2006). Os granulomas são descritos como sistemas dinâmicos, multifacetados e auto-organizados com componentes tanto do hospedeiro como do parasito. A formação de granulomas é um processo dinâmico que envolve o acúmulo de células imunes no local de liberação

antigênica, levando ao confinamento do agente causador, que no caso trata-se do ovo com a larva miracídio (CHUAH; JONES; BURKE; MCMANUS *et al.*, 2014; LENZI; KIMMEL; SCHECHTMAN; PELAJO-MACHADO *et al.*, 1998; LENZI; ROMANHA; SANTOS; ROSAS *et al.*, 2006; PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018).

Para o hospedeiro, a resposta granulomatosa é considerada tanto protetora como patológica (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Granulomas, durante a esquistossomose mansônica, são formados principalmente em intestinos e fígado do hospedeiro vertebrado. Nesses dois ambientes, granulomas apresentam funções diferentes. No fígado o granuloma apresenta-se como uma estrutura protetiva com função de isolar os ovos e as toxinas hepatotóxicas liberados pela larva miracídio dentro do ovo. Granulomas hepáticos não podem ser eliminados pelo organismo hospedeiro e se tornam fibróticos ao longo do tempo. Em contrapartida no intestino ele tem a função de carrear os ovos para o lúmen intestinal e dar continuidade ao ciclo de vida do parasito (CHUAH; JONES; BURKE; MCMANUS *et al.*, 2014; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013; SCHWARTZ; FALLON, 2018). A casca do ovo inibe a formação de granuloma por tempo suficiente para o amadurecimento da larva miracídio (TAKAKI; RINALDI; BERRIMAN; PAGÁN *et al.*, 2021). Em seguida, os antígenos do parasito secretados pela larva confinada no ovo desencadeiam granulomas que facilitam a extrusão do ovo no ambiente. Em apoio a esse modelo, apenas ovos maduros de *S. mansoni* são eliminados nas fezes de camundongos e humanos. Acredita-se que os granulomas intestinais transportam os ovos até o lúmen intestinal e lá o liberam. Os ovos coletados tanto em fezes humanas quanto em fezes de animais de experimentação não são encapsulados por granulomas e não apresentam células imunes (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Os granulomas provocados pela esquistossomose têm tamanho e composição celular variáveis, dependendo das fases evolutivas em que se encontram. A organização estrutural dos estágios dos granulomas, que se baseia em análises histológicas, é, portanto, complexa e várias classificações têm sido propostas e utilizadas para estudar infecções humanas e experimentais (AMARAL; SILVA; DIAS; MALTA *et al.*, 2017; HSÜ; HSÜ; DAVIS; LUST, 1972; HSÜ; HSÜ; LUST; DAVIS *et al.*, 1973; LENZI; KIMMEL; SCHECHTMAN; PELAJO-MACHADO *et al.*, 1998; LENZI; ROMANHA; SANTOS; ROSAS *et al.*, 2006). No entanto, até o momento, uma caracterização abrangente e aprofundada da composição do granuloma intestinal ainda não foi documentada (SCHWARTZ; FALLON, 2018). Devido à longevidade da infecção e constante

deposição de ovos, avaliar a ordem temporal dos eventos durante a formação do granuloma no intestino é um desafio.

Os parasitos adultos *S. mansoni* fêmeas depositam seus ovos próximo a vasculatura que envolve os intestinos e exploram o mecanismo de proteção do hospedeiro para facilitar a passagem dos ovos, a fim de transportá-los através do endotélio e da parede intestinal para o lúmen intestinal. Estima-se que os ovos de *S. mansoni* são viáveis por aproximadamente 21 dias (LENZI; ROMANHA, 2003), indicando que os ovos completam a transição através da parede intestinal bem dentro desse período, mas em não menos que 6 dias. Portanto, os granulomas intestinais terão características observadas nos granulomas hepáticos em estágio inicial. Análises histológicas mostraram que a composição do granuloma do cólon difere dos granulomas do fígado, abrigando mais macrófagos, mas menos eosinófilos, células T e B (WEINSTOCK; BOROS, 1983).

A ecologia celular, ciência que estuda as interações e o comportamento de células em seus microambientes, tem sido bastante utilizada na compreensão de sistemas biológicos como sistemas ecológicos, principalmente em câncer (KAREVA, 2011; 2015; LACINA; KODET; DVOŘÁNKOVÁ; SZABO *et al.*, 2018). Recentemente, nosso grupo propôs que o granuloma hepático causado pelo parasito *S. mansoni* atua como um ecossistema sendo formado através do processo de sucessão ecológica (MALTA; SILVA; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2021). Granulomas apresentam componentes bióticos, diversas populações celulares de células inflamatórias e também residentes teciduais, e abióticos, além de matriz extracelular rica em colágeno, proteínas estruturais e solúveis. No entanto, aspectos ecológicos, como diversidade celular e distribuição populacional em estágios sucessionais de desenvolvimento do granuloma, ainda são pouco compreendidos.

Com uma abordagem de ecologia celular, investigamos no presente trabalho aspectos da composição e estrutura da comunidade celular de granulomas intestinais e hepáticos assim como o desenvolvimento espaço-temporal dos mesmos durante a infecção experimental por *S. mansoni*. Através da técnica WSI (*Whole Slide Imaging*), realizamos um estudo detalhado e comparativo acerca da composição espaço-temporal da comunidade celular dos granulomas dos diferentes órgãos alvo. Com análises qualitativas e quantitativas, caracterizamos a comunidade celular do granuloma hepático e intestinal ao longo da sua dinâmica espaço-temporal de desenvolvimento. Foram aplicadas algumas estratégias clássicas de investigações descritivas da comunidade dos granulomas, como avaliação da abundância, densidade e diversidade que revelaram a

complexidade estrutural e funcional destas estruturas. Adicionalmente, por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram descritos potenciais interações entre as populações do granuloma. O melhor entendimento do granuloma esquistossomótico como uma estrutura capaz de constituir-se como um ecossistema 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.

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Animais e infecção experimental

Camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster* (n=16) 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.

8.2.2 Eutanásia e coleta de amostras

Animais infectados (n=12) e controles (n=4) não infectados foram eutanasiados após 55 (n=6) e 115 dias (n=6) de infecção, que correspondem à fase aguda e crônica da doença (DIAS; AMARAL; MALTA; SILVA *et al.*, 2018). Os animais foram eutanasiados em câmara de CO² e, em seguida, fragmentos de intestino grosso e 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.

8.2.3 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.

8.2.4 Técnicas histológicas

8.2.4.1 Inclusão em resina glicolmetacrilato (GMA)

Todas as amostras foram incluídas em resina GMA, resina plástica que permite melhor resolução e evita retrações do tecido quando comparada à inclusão em parafina (MELO; ROSA; NOYMA; PEREIRA *et al.*, 2007). O processo de inclusão em GMA permite a coloração direta do material biológico 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 ótima resolução das células ao microscópio de luz e de outros constituintes teciduais, incluindo granulomas (DIAS; AMARAL; MALTA; SILVA *et al.*, 2018).

Fragmentos de intestino grosso e fígado (n=3 para cada animal) foram incluídos em blocos de resina GMA conforme descrito anteriormente (AMARAL; SILVA; DIAS; MALTA *et al.*, 2017; DIAS; AMARAL; MALTA; SILVA *et al.*, 2018). Brevemente, seguiu-se a etapa de desidratação por 20 minutos cada. Após a desidratação em série crescente de álcoois [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, em que 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.

8.2.4.2 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 detalhado abaixo:

- 1) solução mordente de alúmen de ferro a 2% por 10 minutos;
- 2) água corrente por 5 minutos;
- 3) hematoxilina de Harris por 30 segundos;
- 4) água corrente por 10 minutos;
- 5) diferenciação em álcool acidulado por 1:30 minutos;
- 6) água corrente por 10 minutos;
- 7) eosina aquosa por 30 segundos;
- 8) água corrente até que o excesso de corante fosse retirado;
- 9) secagem a temperatura ambiente;
- 10) 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.

8.2.5 Whole Slide Imaging (WSI)

Após a montagem das lâminas permanentes com Entellan®, as análises dos granulomas e das populações celulares componentes foram realizadas por WSI. Esta técnica consiste na digitalização de lâminas histológicas, 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 (MELO; RAAS; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2020).

Estudos anteriores do grupo mostraram que o WSI é uma ferramenta eficiente e precisa para avaliação da distribuição, tamanho e estágios evolutivos de granulomas esquistossomóticos em diferentes modelos de animais (AMARAL; SILVA; DIAS;

MALTA *et al.*, 2017; AMARAL; SILVA; MALTA; CARMO *et al.*, 2016; MELO; RAAS; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2020). No presente trabalho, as lâminas (n= 3 para cada fragmento intestinal e hepático, controle e infectado) 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; SILVA; DIAS; MALTA *et al.*, 2017). As lâminas foram analisadas utilizando os softwares *Pannoramic Viewer 1.15.2 SP2 RTM* (3D Histech kft) e *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 parâmetros qualitativos e quantitativos descritos a seguir.:

Animais (grupos)	Fragmentos /animal	Secções /Fragmento	Total Lâminas analisadas		Granulomas analisados	Células
	n	n	Área (mm ²)	n	n	n
Controle	4	12	103.905,18	12	0	0
Intestino	6	18	217.282,74	18	79	28.673
Fígado	6	18	217.282,74	18	442	158.988

8.2.6 Média de granuloma por órgão-alvo e estágio evolutivo

Para mostrar um panorama geral da ocorrência de granulomas no intestino e fígado durante a infecção experimental por *S. mansoni*, com auxílio do software *Pannoramic Viewer* estes foram identificados, de acordo com seu estágio evolutivo, quantificados e a área dos granulomas mensuradas. Assim, foi estabelecido a média de granulomas por órgão alvo; a média de granulomas por estágio evolutivo e a área média dos granulomas por estágio evolutivo.

8.2.7 Classificação morfológica dos granulomas em estágios evolutivos

Para o estudo temporal do desenvolvimento dos granulomas hepáticos e intestinais, estes foram investigados de acordo com o seu estágio evolutivo. Em trabalhos

anteriores, nosso grupo de pesquisa delineou a classificação morfológica dos granulomas em 4 estágios evolutivos relacionados a escala temporal de desenvolvimento (AMARAL; SILVA; DIAS; MALTA *et al.*, 2017; AMARAL; SILVA; MALTA; CARMO *et al.*, 2016; DIAS; AMARAL; MALTA; SILVA *et al.*, 2018), sendo estes:

- (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-exsudativo (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.

8.2.8 Identificação e classificação das células imunes para delimitação de populações celulares

Sob o ponto de vista ecológico, considerando o granuloma como um ecossistema cada célula pode ser considerada uma espécie que realiza seus nichos específicos desempenhando diferentes papéis na manutenção e funcionamento do granuloma (MALTA; SILVA; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2021). Os diferentes tipos de células inflamatórias podem representar a diversidade de populações que compõe a comunidade celular neste ecossistema. No granuloma, uma estrutura espaço-temporal, cada população celular pode ser definida como conjunto de células do mesmo tipo celular que interagem entre si (MALTA; SILVA; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2021). Nesta perspectiva, diferentes populações também interagem entre si formando a comunidade celular do granuloma (MALTA; SILVA; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2021). No presente trabalho, através do WSI, com auxílio dos softwares *Pannoramic Viewer* (1.15.2 SP2 RTM 3D Histech kft) e *Histoquant* (3D Histech kft) foi possível identificar e quantificar todas as células encontradas em todos os estágios evolutivos dos granulomas intestinais e hepáticos. 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 formados em torno do ovo do parasito *S. mansoni* (BENTLEY; DOUGHTY; PHILLIPS, 1982; LENZI; KIMMEL; SCHECHTMAN; PELAJO-MACHADO *et al.*, 1998; MALTA; SILVA; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2021). Foram avaliados parâmetros fenotípicos como a morfologia nuclear, características citoplasmáticas e diâmetro das células. Na Figura 1 encontram-se organizados os critérios utilizados na classificação das populações celulares encontradas nos granulomas intestinais e hepáticos. Os diâmetros das células foram calculados com o auxílio do software *Image J*, após captura de imagens no *Pannoramic Viewer*.

Populações Celulares	
Macrófagos Epitelióides	Possui volume aumentado; Núcleo alongado com cromatina frouxa (lembrando o núcleo de fibroblastos); Citoplasma abundante e róseo com limites imprecisos.
Eosinófilos	Núcleo bilobulado ou polilobulado; Citoplasma róseo fortemente corado por eosina.
Mononucleares	Núcleo redondo ou ovalado com cromatina frouxa; Citoplasma abundante, redondo e bem delimitado podendo conter elementos fagocitados (principalmente hemozoína); Forma celular variável de arredondada a alongada.
Linfócitos	Núcleo redondo, denso e pequeno; Citoplasma muito escasso (quase não visível).
Granulócitos	Núcleo bilobulado ou polilobulado; Citoplasma bem delimitado.
Plasmócitos	Possui formato ovalado; 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.
Células Gigantes	Células volumosas com 3 ou mais núcleos arranjados em ferradura na periferia da célula ou dispersos pelo citoplasma; Citoplasma abundante; Podendo conter ou não pigmento de hemozoína no citoplasma.
Fibroblastos	Núcleo ovalado ou alongado com cromatina frouxa; Citoplasma escasso podendo formar prolongamentos saindo dos pólos nucleares.
Não Identificáveis	Núcleo não identificável com aspectos de morte celular ou em divisão; Citoplasma abundante; Foram consideradas as células dos epitélios intestinais e do parênquima hepático (hepatócitos).

Figura 1: Caracterização das populações celulares nos granulomas intestinais e hepáticos.

8.2.9 Avaliação ecológica da estrutura da comunidade celular nos granulomas hepáticos e intestinais

Classicamente na ecologia, a estrutura de uma comunidade está relacionada com a composição e diversidade de espécies e das forças evolutivas que moldam estes padrões (MAGURRAN, 2011). Os parâmetros relacionados com a estrutura da comunidade celular nos granulomas, assim como a composição da comunidade celular, a abundância de cada população além da densidade e da diversidade celular encontram-se descritos abaixo/.

8.2.9.1 Avaliação espaço- temporal quantitativa das populações celulares dos granulomas

Para avaliação da composição celular da comunidade do granuloma nos diferentes estágios evolutivos, todas as células classificadas em suas determinadas populações, foram discriminadamente quantificadas com auxílio do software *Histoquant*. Após a obtenção dos dados foram calculadas a abundância e densidade das populações celulares nos granulomas, aspectos descritivos da comunidade celular dos granulomas intestinais e hepáticos.

Tradicionalmente na ecologia a abundância representa o número de indivíduos de uma espécie dentro da comunidade em um ecossistema e pode ser dada pelo número populacional absoluto ou relativo de uma determinada espécie (ODUM; BARRET, 2007). No presente trabalho foram calculadas a abundância proporcional de células, representada pela frequência (%) de cada população celular para os quatro estágios evolutivos nos granulomas (PE, NE, EP e P) intestinais e hepáticos. Para avaliar a dinâmica temporal das populações celulares nos diferentes granulomas, foram utilizados os dados de abundância proporcional nos estágios evolutivos dos granulomas que representam o aspecto temporal do desenvolvimento desta estrutura.

A densidade populacional é outro parâmetro quantitativo relacionado a quantidade de indivíduos em uma determinada população em um espaço definido (ODUM; BARRET, 2007). Frequentemente, a densidade é dada pela contagem do número de indivíduos da população por unidade de área (ODUM; BARRET, 2007). A densidade de cada população celular nos granulomas 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)*.

8.2.9.2 Avaliação da diversidade na composição da comunidade celular dos granulomas

A diversidade é composta pela variedade de espécies (i.g. riqueza) e o número de indivíduos dentro de cada espécie, que estão relacionados aos padrões de variação espacial e ambiental (MAGURRAN, 2011; ODUM; BARRET, 2007). Desse modo, quanto maior a variação, maior será a diversidade de espécies do ecossistema. A diversidade é um parâmetro possível de ser mensurado por índice matemáticos cujos valores encontrados podem ser explicados por uma série de teorias. A diversidade é tradicionalmente considerada uma função tanto da riqueza quanto da uniformidade, com comunidades menos uniformes sendo menos diversas do que sua riqueza sozinha indicaria (MAGURRAN, 2011). Com auxílio do software Past 4.03 (HAMMER; HARPER; RYAN., 2001) para avaliação da diversidade celular nos granulomas foram utilizados os seguintes parâmetros e índices:

- **Riqueza:** A riqueza pode ser entendida como a variedade de espécies encontrada em um local ou numa comunidade. Ela consiste no número total de espécies (ou outro táxon) encontrada em determinada comunidade (MAGURRAN, 2011). Aqui a riqueza foi mensurada através do levantamento da composição da comunidade celular dos granulomas em todos os estágios evolutivos do granuloma;

- **Índice de diversidade de Shannon-Weiner:** O índice mais usado para medir a diversidade de uma comunidade é o índice de Shannon - Wiener (1949). Este índice dá maior peso para as espécies raras (MAGURRAN, 2011). Para os granulomas foram utilizados as diferentes populações celulares e suas respectivas abundâncias. Nos granulomas, consideramos com “espécies comuns” as populações celulares mais abundantes e as espécies raras as populações celulares menos abundantes.

- **Índice de diversidade de Simpson:** Simpson (1949) apresentou a probabilidade de quaisquer indivíduos sorteados de uma comunidade infinitamente grande pertencer à mesma espécie. O índice de Simpson é uma das medidas de diversidade mais significativas e robustas disponíveis. Em essência, ele captura a variação da distribuição

de abundância das espécies (MAGURRAN, 2011). Para a análise dos granulomas foram consideradas como “espécies” as diferentes populações celulares e suas respectivas abundâncias.

-Similaridade: As medidas de similaridade de espécies são amplamente utilizadas em ecologia de comunidades, uma vez que permitem comparar diferentes comunidades, acompanhar alterações em uma mesma comunidade ao longo das estações do ano ou antes e após algum evento modificador, quanto à composição qualitativa e, ou quantitativa dos organismos presentes (MAGURRAN, 2011). No presente trabalho a similaridade foi avaliada considerando a abundância das populações celulares através da realização de análises de agrupamento para investigar quais comunidades celulares eram mais similares.

- Equitabilidade: também chamada de uniformidade, é uma medida de quão diferentes as abundâncias das espécies em uma comunidade são umas das outras. Uma comunidade onde todas as espécies tivessem a mesma abundância seria perfeitamente equilibrada. Todas as comunidades naturais são altamente desiguais, então a uniformidade é uma afirmação relativa. A maioria dos índices de uniformidade são dimensionados para aproximadamente ir de 0= máxima desigual a 1= perfeitamente uniforme (MAGURRAN, 2011). A equitabilidade foi estabelecida através da abundância proporcional das populações celulares presentes na comunidade do granuloma;

- Dominância: Dominância é uma medida de quanto uma ou algumas espécies dominam a comunidade numericamente. De certa forma, é o inverso da uniformidade(MAGURRAN, 2011). A dominância foi gerada através da análise das abundâncias proporcionais das populações celulares dos granulomas.

8.2.10 Processamento das amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os granulomas foram avaliados ultraestruturalmente para o reconhecimento de interações celulares que potencialmente ocorrem no granuloma esquistossomótico (MALTA; SILVA; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2021). Tais interações celulares ainda são pouco conhecidas.

Fragmentos de intestinos e fígado de animais infectados experimentalmente com *S. mansoni* foram coletados, imediatamente fixados com Karnowsky modificado (1% paraformaldeído e 1,25% de glutaraldeído). Após 2 h os fragmentos foram cortados em pedaços menores (1mm³) colocados no mesmo fixador overnight na geladeira (4°C). Os fragmentos foram lavados 2 x com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e processados para MET, conforme anteriormente (DIAS; AMARAL; MALTA; SILVA *et al.*, 2018). Posteriormente, todos os fragmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão Sym-Collidine, pH 7,4, por 2 h a temperatura ambiente. Após lavagem com tampão maleato de sódio, pH 5,2, foram contrastadas *in bloc* em acetato de uranila 2% (EMS) em tampão de maleato de sódio 0,05 M, pH 6,0, por 2 h à temperatura ambiente e lavado no mesmo tampão de antes da desidratação em sequência graduada de álcoois e acetona. A infiltração e inclusão foi realizada em sequência de óxido de propileno-epon (Resina Eponate 12; Ted Pella, Redding, CA, EUA). Após polimerização a 60°C por 16 h, cortes ultrafinos foram cortados com navalhas de diamante em ultramicrotomo (Leica, Bannockburn, IL). As seções foram montadas em telinhas gradeadas de malha de cobre (Ted Pella) e contrastadas com citrato de chumbo. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (CM 10; Philips, ou Tecnai G2-20-ThermoFischer Scientific/FEI 2006, Eindhoven, Holanda) a 60–80 KV.

Micrografias eletrônicas de diferentes experimentos (n = 3) foram capturadas aleatoriamente em ampliações diferentes para estudar as características ultraestruturais das células nos granulomas. Foram avaliadas interações de contato célula-célula em 24 micrografias diferentes representando uma área amostral do granuloma de aproximadamente 640 µm².

8.2.11 Análises estatísticas

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 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 GraphPad Prism® 8.01(San Diego, CA,USA). O grau de significância empregado para todas as análises foi $p \leq 0,05$.

9. RESULTADOS

9.1 Ocorrência de granulomas esquistossomóticos no intestino grosso e fígado de camundongos experimentalmente infectados

Camundongos foram infectados ou não com o parasito *Schistosoma mansoni*. Eles foram eutanasiados em dois momentos diferentes da infecção, aos 55 e 115 dias respectivamente o que caracteriza a fase aguda e crônica da doença. Nós utilizamos essa estratégia de eutanásia a fim de captar granulomas em diversos estágios evolutivos de desenvolvimento nos órgãos alvo aqui investigados, intestino grosso e fígado. Secções de intestino e fígado, controle e infectado, foram processados através da técnica convencional de histologia e as lâminas provenientes do processamento foram escaneadas e analisadas por WSI. As amostras dos animais controles, apresentaram parênquima intestinal e hepático totalmente homogêneos, sem a presença de nenhum granuloma ou infiltrado inflamatório (Figura 2 A, B). Já as amostras de animais infectados apresentaram diversos infiltrados inflamatórios e a formação de granulomas em torno dos ovos do parasito, o que confirma o estabelecimento da infecção por *S. mansoni* nesses animais (Figura 2 C, D). Dados quantitativos por WSI revelaram $16 \pm 9,09$ (média \pm DV) e $55 \pm 19,74$ (média \pm DV) granulomas nos intestinos e fígados dos animais infectados, respectivamente (Figura 2 E).

Para o estudo temporal do desenvolvimento granulomatoso, os granulomas hepáticos e intestinais foram investigados de acordo com o seu estágio evolutivo. No fígado foram encontrados todos os estágios evolutivos do granuloma, desde granulomas iniciais no estágio pré-granulomatoso (PE) como granulomas em estágios intermediários (NE) e mais tardios de desenvolvimento (EP, P). Em contrapartida, no intestino foram encontrados apenas granulomas PE e EP.

No fígado, granulomas EP ($10 \pm 6,36$ granulomas/secção; Média \pm DV) são mais numerosos, enquanto granulomas PE apresentaram-se em menor quantidade ($7 \pm 6,97$ granulomas/secção; Média \pm DV). Inclusive, os granulomas EP hepáticos foram significativamente ~30% mais frequentes que os granulomas EP intestinais. No intestino não houve diferença significativa entre granulomas PE e EP ($p > 0,05$) (Figura 2 F).

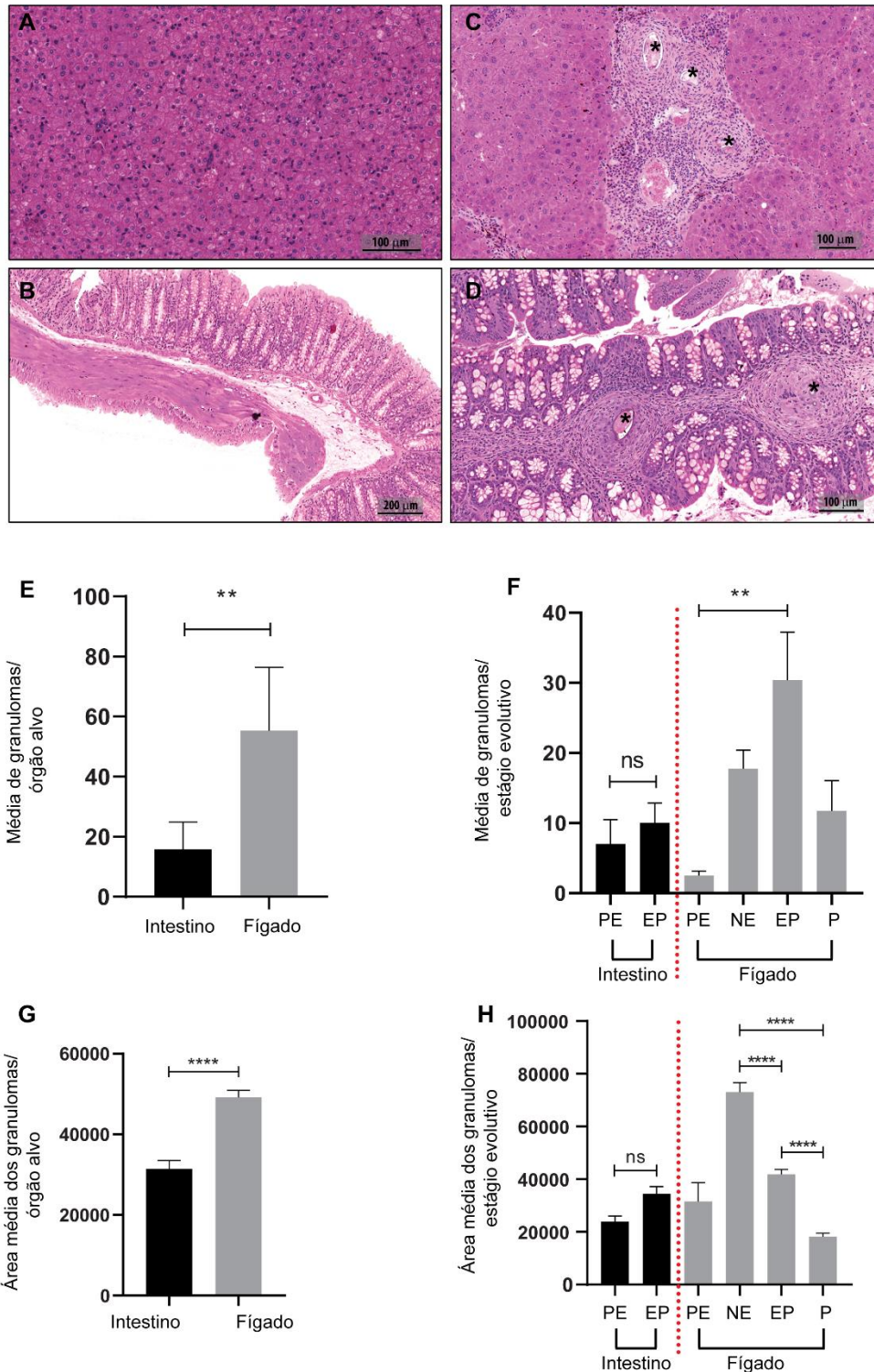


Figura 2: A esquistossomose mansônica desencadeia a formação de granulomas no intestino e fígado. (A) Parênquima hepático íntegro. (B) Epitélio intestinal íntegro. (C) Tecido hepático infectado contendo granulomas em torno dos ovos (*). (D) Epitélio intestinal infectado contendo granulomas em torno dos ovos (*). (E) Média de granulomas por órgão-alvo. (F) Média de granulomas por estágio evolutivo. (G) Área média dos granulomas por órgão-alvo. (H) Área média dos granulomas por estágio evolutivo. Diferenças estatísticas estão representadas por símbolos: ns: não significante; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Em relação ao tamanho dos granulomas, de maneira geral, granulomas intestinais foram menores que granulomas hepáticos (Figura 2 G). No fígado, houve diferença estatística entre os granulomas mais tardios (NE e EP: $p < 0,0001$); NE e P: $p < 0,0001$ e EP e P: $p < 0,0001$; Figura 2 H). Não foi encontrada diferença significativa entre os granulomas de mesmo estágio evolutivo nos diferentes órgãos-alvo.

9.2 Comunidade de células inflamatórias nos granulomas

Para caracterização da comunidade de celular dos granulomas hepáticos e intestinais, foram identificadas diferentes populações celulares com base em características morfológicas fenotípicas distintas entre si, conforme descrito anteriormente (secção 2.10.2).

No geral, foram classificadas e quantificadas 187.661 células nos granulomas intestinais e hepáticos (28673 nos granulomas intestinais e 158.988 nos granulomas hepáticos). Tais células foram distribuídas em 9 populações celulares: Macrófagos epitelióides, eosinófilos, mononucleares, linfócitos, granulócitos, plasmócitos, células gigantes e fibroblastos (Figura 3). Células não identificáveis foram no total 1308 células, representando apenas 0,7 % da quantidade de células totais analisadas.

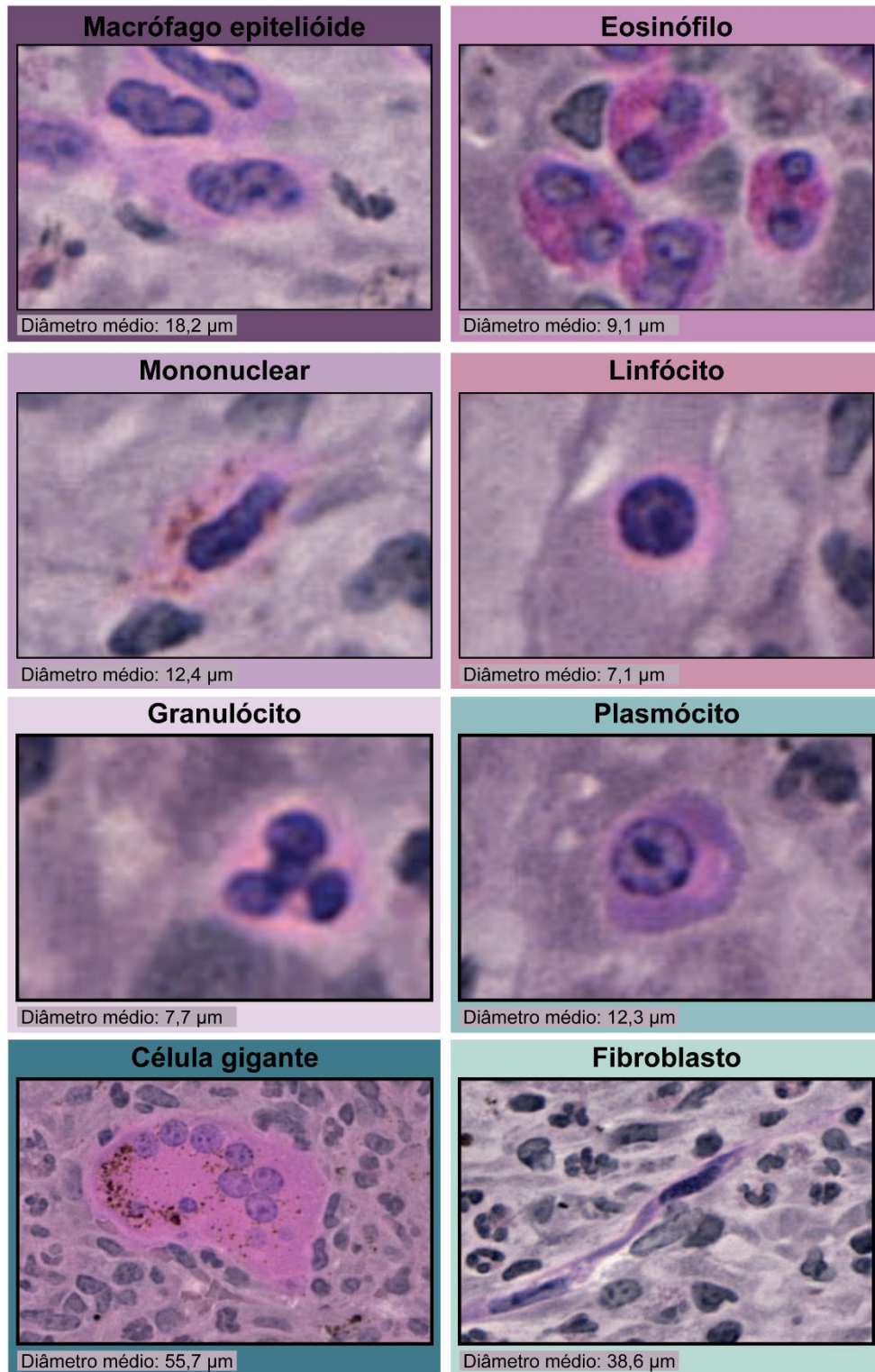


Figura 3: Populações celulares encontradas nos granulomas intestinais e hepáticos durante a esquistossomose mansônica e seus diâmetros médios.

9.3 Abundância populacional nos granulomas hepáticos e intestinais

Inicialmente, foi investigado a abundância total de células por estágio evolutivo dos granulomas (Figura 4A). Todas as células dos granulomas do fígado e intestino foram quantificadas por WSI. Nos granulomas hepáticos, enquanto os granulomas NE apresentaram a maior quantidade de células ($498,8 \pm 258,9$ células por granuloma; Média \pm DV), granulomas em estágio mais tardio (P) apresentaram a menor ($128,3 \pm 54,63$ células por granuloma; Média \pm DV; Figura 4A). Não foi encontrada diferença estatística do número médio de células nos granulomas PE e EP intestinais.

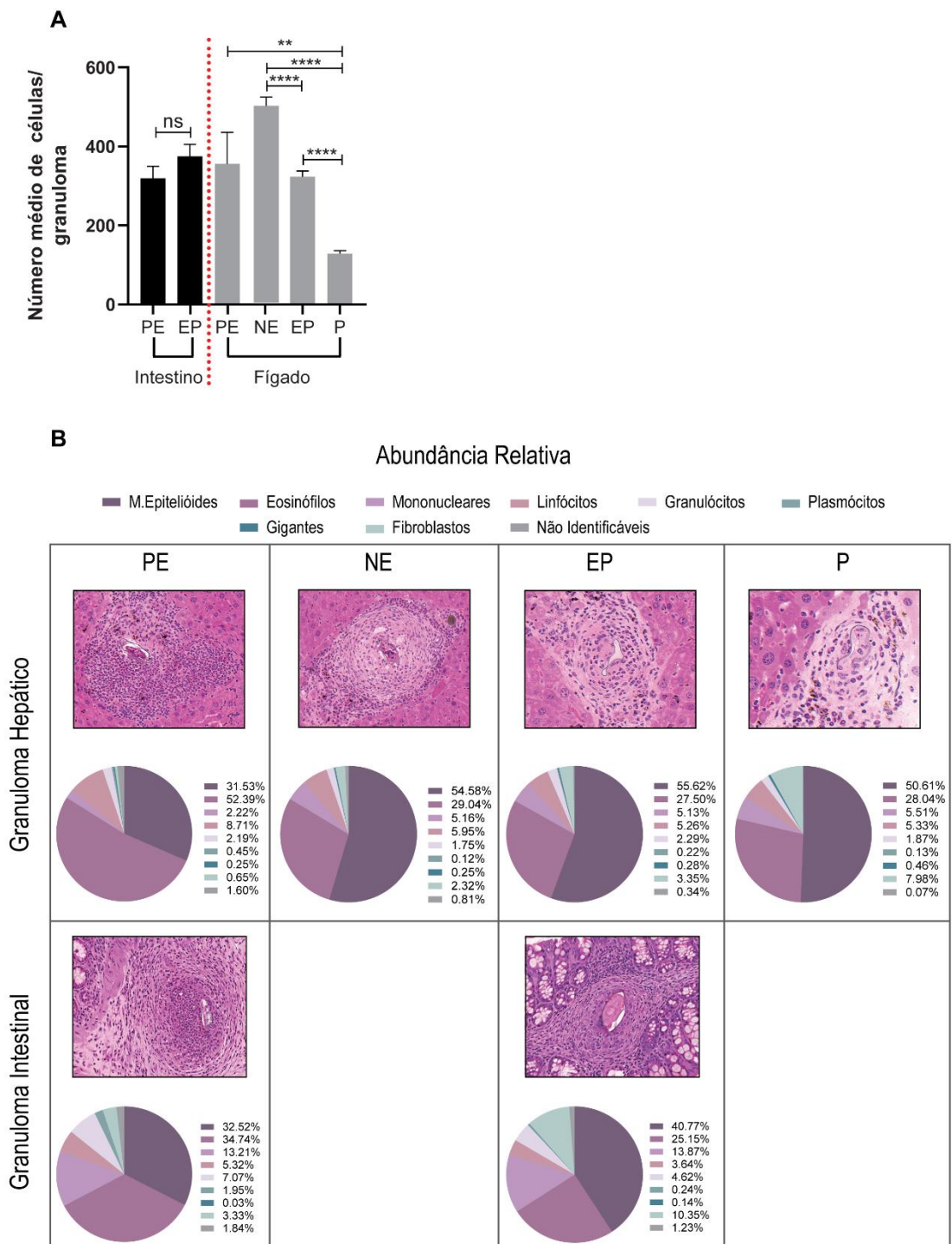


Figura 4: Distribuição das populações celulares nos granulomas hepáticos e intestinais. (A) Número médio de células por granulomas. (B) Abundância relativa proporcional das populações celulares nos diferentes estágios evolutivos dos granulomas hepáticos e intestinais. (PE) pré-granulomatoso exudativo: caracterizado pela presença de populações de células inflamatórias migrantes recém chegadas ao tecido em torno do ovo do parasito. (NE) necrótico-exudativo: caracterizado por uma área central de necrose e numerosas populações celulares inflamatórias distribuídas irregularmente nas camadas subsequentes; (EP) exudativo produtivo: granuloma rico em matriz extracelular colagênica o que configura o aspecto mais arredondado e populações celulares distribuídas de maneira organizada; (P) produtivo: apresenta uma faixa espessa de matriz extracelular colagênica em torno do ovo. As populações de células inflamatórias mais concentradas na periferia. Gráficos de setores indicam a abundância proporcional das populações celulares encontradas nos granulomas hepáticos e intestinais. Diferenças estatísticas estão representadas por símbolos: ns: não significante; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Para estimar a abundância proporcional de cada população celular nos granulomas, cada célula inflamatória foi discriminadamente quantificada por WSI utilizando o software *Pannoramic Viewer* com o módulo Histoquant. Então, a abundância foi determinada pela proporção de uma população de células considerando toda a comunidade celular do granuloma (Figura 4 B). Dados quantitativos mostraram que a abundância relativa de todas as populações celulares variou de acordo com o estágio evolutivo do granuloma. Aparentemente, não houveram variações aparentes na abundância das populações celulares entre os órgãos alvos, fígado e intestino. Em todos os granulomas, as populações mais abundantes foram as de macrófagos epitelióides (~30-55 %) e eosinófilos (~25-52 %), enquanto as menos abundantes foram as de plasmócitos (~0,65-10 %) e células gigantes (0,03 – 0,46 %).

Em seguida foi investigada a dinâmica temporal de cada população celular de acordo com os estágios evolutivos nos granulomas hepáticos e intestinais. Nos granulomas hepáticos a proporção de macrófagos epitelióides e mononucleares aumentam após o estágio inicial (PE) e se mantem constante; Figura 5 A e B), enquanto que a proporção de eosinófilos e linfócitos diminuem significativamente (Figura 5 C e D). Nessas populações a proporção de células se mantêm constante até o estágio final de evolução dos granulomas (P; Figura 5 A-D). Enquanto isso, a população de fibroblastos aumenta progressivamente ao longo dos estágios evolutivos do granuloma hepático (Figura 5 E). Por outro lado, as populações de granulócitos, plasmócitos e células gigantes não variam em proporção ao longo do desenvolvimento dos granulomas (Figura 5 F e G). No intestino, a abundância proporcional de plasmócitos diminuiu significativamente, ao

passo que a de fibroblastos aumentou e não houve diferença estatística na abundância de células na escala temporal das demais populações celulares ($p > 0,05$).

Foram encontradas algumas variações na abundância de células, entre os órgãos alvo (i.g. fígado *vs.* Intestino), quando comparada a mesma população no mesmo tipo de granuloma. Macrófagos epitelióides e plasmócitos de granulomas EP foram mais abundantes no fígado do que no intestino ($p < 0,0001$), enquanto granulócitos, mononucleares e fibroblastos de granulomas PE e EP foram mais abundantes no intestino ($p < 0,001$). Eosinófilos foram mais prevalentes no granuloma PE do fígado em comparação com o intestino ($p < 0,05$).

A abundância de células não identificáveis diminuíram progressivamente ao longo do desenvolvimento do granuloma. A proporção dessas células em granulomas EP intestinais foi maior do que em granulomas hepáticos do mesmo estágio ($p = 0,0004$).

Dinâmica temporal das populações celulares

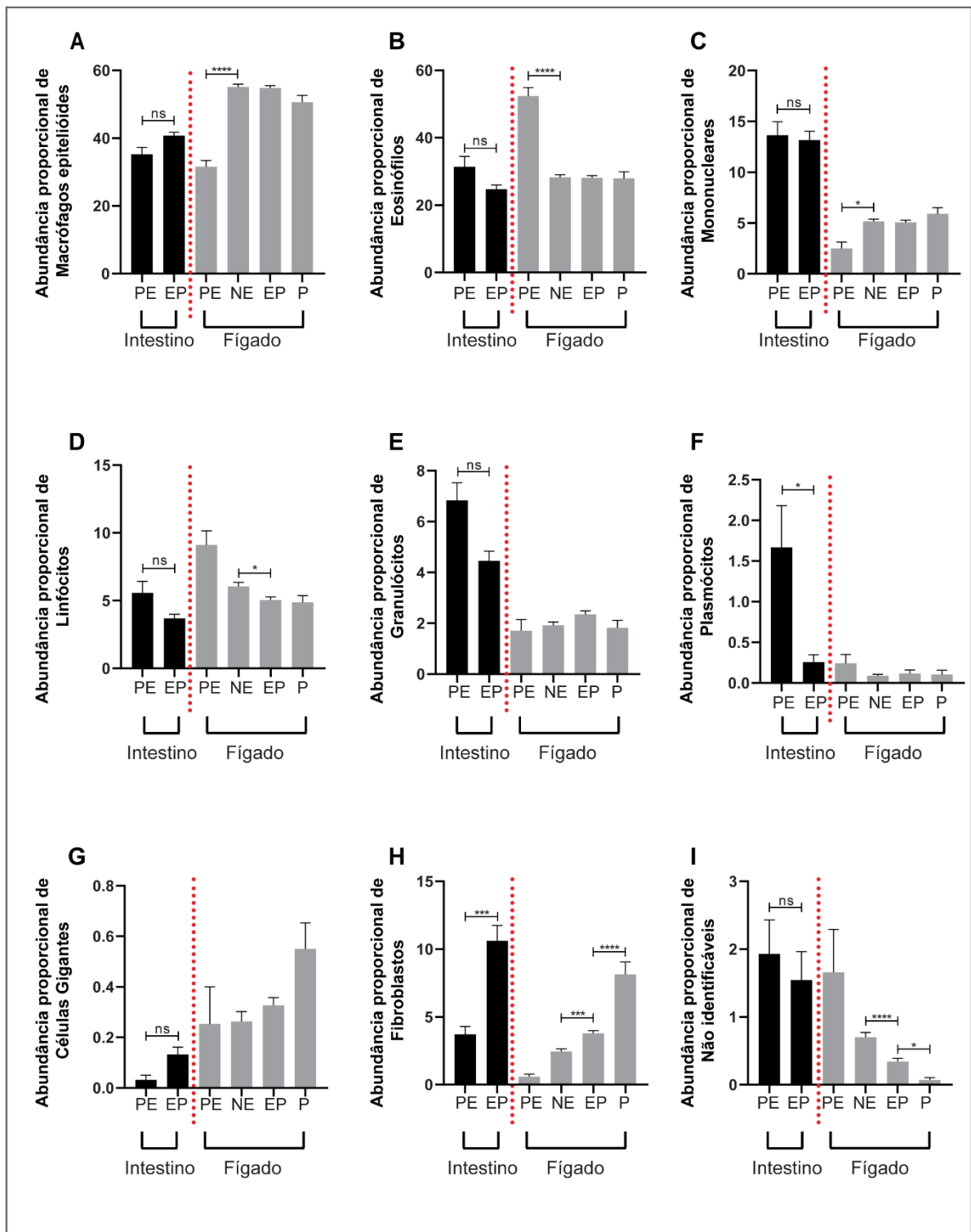


Figura 5: Dinâmica temporal das populações celulares. Representação gráfica do comportamento dinâmico das populações celulares ao longo da formação dos granulomas hepáticos e intestinais. Diferenças estatísticas estão representadas por símbolos: ns: não significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

9.4 Densidade das populações na comunidade celular dos granulomas

Para avaliação da densidade das populações celulares presentes nos granulomas ao longo dos estágios evolutivos nos dois órgãos as populações celulares foram discriminadamente quantificadas e as áreas dos granulomas medidas utilizando o módulo *Histoquant* no *software Pannoramic Viewer*. Os valores das densidades das populações celulares foram estabelecidos pelo número de células por área de granuloma.

Avaliações quantitativas de densidade mostraram que as populações celulares se comportaram de maneira semelhante a abundância. Nos granulomas hepáticos, macrófagos epitelióides e eosinófilos são as populações celulares de maiores densidades. A densidade dessas células se comporta de maneira contrária, enquanto a densidade de macrófagos epitelióides diminui ao longo do tempo, a de eosinófilos aumenta. Podemos observar que a densidade da população de linfócitos diminui na passagem de PE para NE e aumenta em EP e P. Além disso, podemos observar que plasmócitos e células gigantes apresentam baixa densidade durante o processo de desenvolvimento dos granulomas hepáticos. A densidade da população de mononucleares se manteve durante o desenvolvimento do granuloma hepático e a de granulócitos flutuou. Já a densidade de fibroblastos aumentou expressivamente ao longo do tempo (Figura 6 A).

Interessantemente, nos granulomas intestinais, a densidade das populações celulares mais abundantes (macrófagos epitelióides e eosinófilos) e das menos abundantes (mononucleares e linfócitos granulócitos) diminuiu ao longo do tempo. Já a densidade da população de fibroblastos aumentou (Figura 6 B).

Densidade

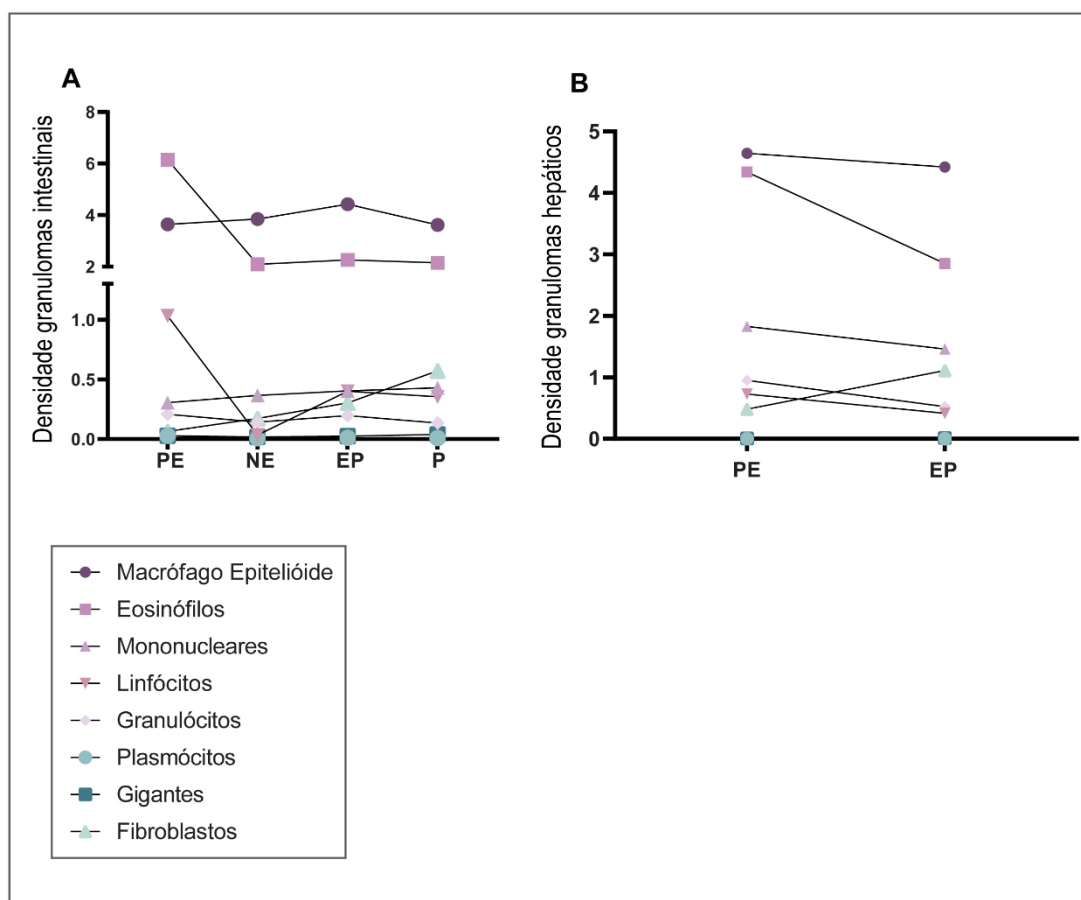


Figura 6: Densidade relativa espaço-temporal das populações celulares dos granulomas hepáticos e intestinais.

9.5 Análises ecológicas de estrutura da comunidade celular dos granulomas

A riqueza é uma medida de diversidade que relaciona o número de espécies que coexistem dentro de uma comunidade e é amplamente utilizada na ecologia. Nos granulomas, a riqueza foi expressa pelo número de distintas populações celulares lá encontradas. Através do WSI identificamos nos granulomas 9 populações celulares, que aqui representam as diferentes “espécies” encontradas nos granulomas. Considerando os granulomas, a riqueza foi a mesma em todos os estágios evolutivos dos diferentes órgãos-alvo.

Em seguida, investigamos quais granulomas apresentavam a composição da comunidade celular mais semelhante durante a evolução espaço-temporal dos granulomas. Para isso, aplicamos a análise de similaridade de Bray Curtis, que considera a abundância das populações para descobrir quais comunidades celulares dos granulomas

eram mais similares. Diferente do que esperávamos, granulomas de mesmo estágio em diferentes órgãos não são similares. A análise mostrou que granulomas de mesmo órgão e de estágios evolutivos diferentes são mais semelhantes, como os granulomas intestinais PE e EP e os granulomas hepáticos NE, EP e P. Inesperadamente, a comunidade do granuloma PE hepático foi o que apresentou menor semelhança em relação a todas as comunidades dos granulomas independentemente do órgão (Figura 7 A). O coeficiente de correlação cofenética, o qual aponta o grau de confiança na análise apresentada no dendrograma e na matriz de similaridade (Figura 7 B), foi de 94,04%.

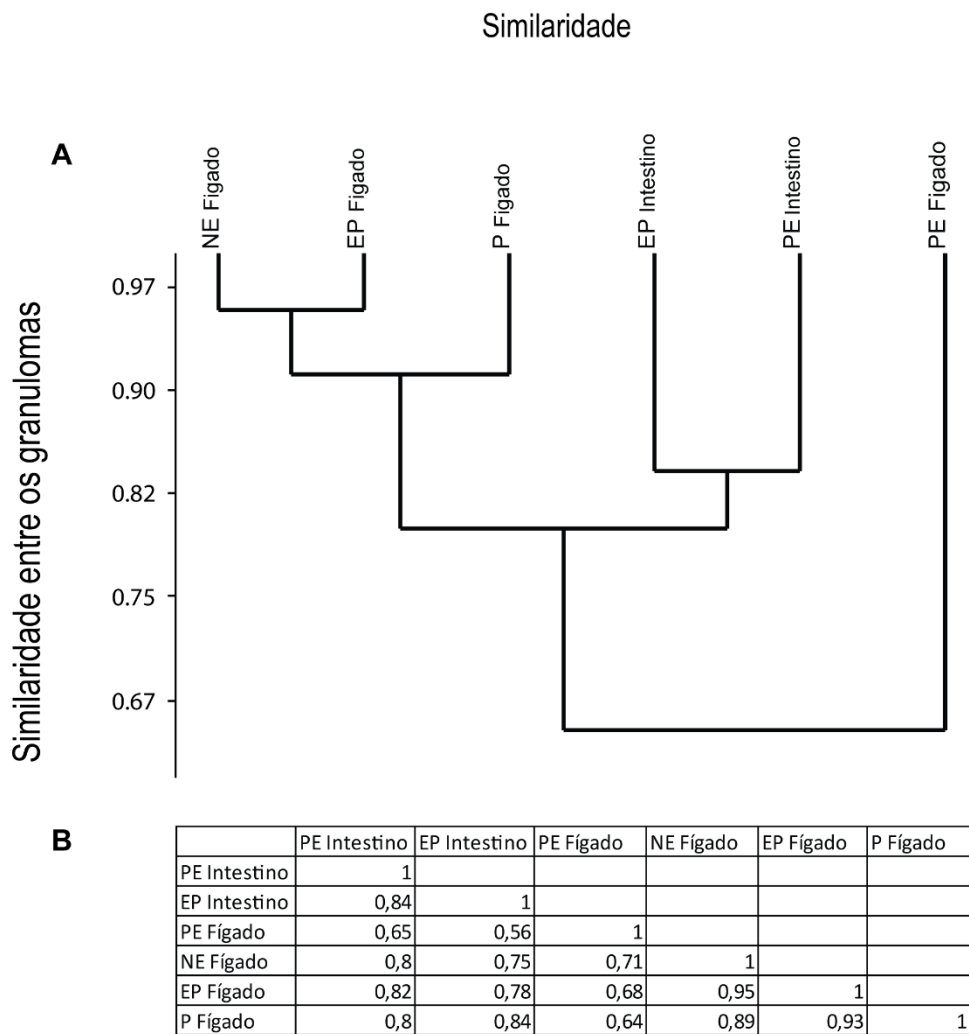


Figura 7: Similaridade entre as comunidades celulares presentes nos granulomas. (A) Dendrograma. (B) Matriz de similaridade.

Por fim, para avaliar a diversidade da comunidade celular de células inflamatórias presentes nos granulomas, aplicamos índices de diversidade usualmente utilizados para medir a diversidade de comunidades em diversos ecossistemas. Aqui aplicamos os índices

de Shannon e Simpson. Além disso, investigamos também a equitabilidade e a dominância nas comunidades celulares presentes nos granulomas.

Nossas análises mostram que granulomas intestinais, independente do estágio evolutivo são os que apresentam maiores valores de diversidade, principalmente o granuloma PE, quando aplicamos os índices Shannon e Simpson (Figura 8 A, B). Nos granulomas hepáticos, os granulomas no estágio P são os que apresentam maiores índices de diversidade.

A equitabilidade e a dominâncias expressam como o número de indivíduos está distribuído entre as diferentes espécies, ou seja, indicam se as diferentes “espécies” possuem abundância semelhantes ou divergentes. Considerando a comunidade celular, granulomas intestinais são os que apresenta maiores equitabilidades e menores dominância (Figura 8 C,D), ou seja, as abundâncias das populações celulares das comunidades dos granulomas intestinais são mais uniformes que nos granulomas hepáticos. Quanto mais parecidas forem as espécies em uma comunidade, maior será a equitabilidade e menor será a dominância).

Diversidade

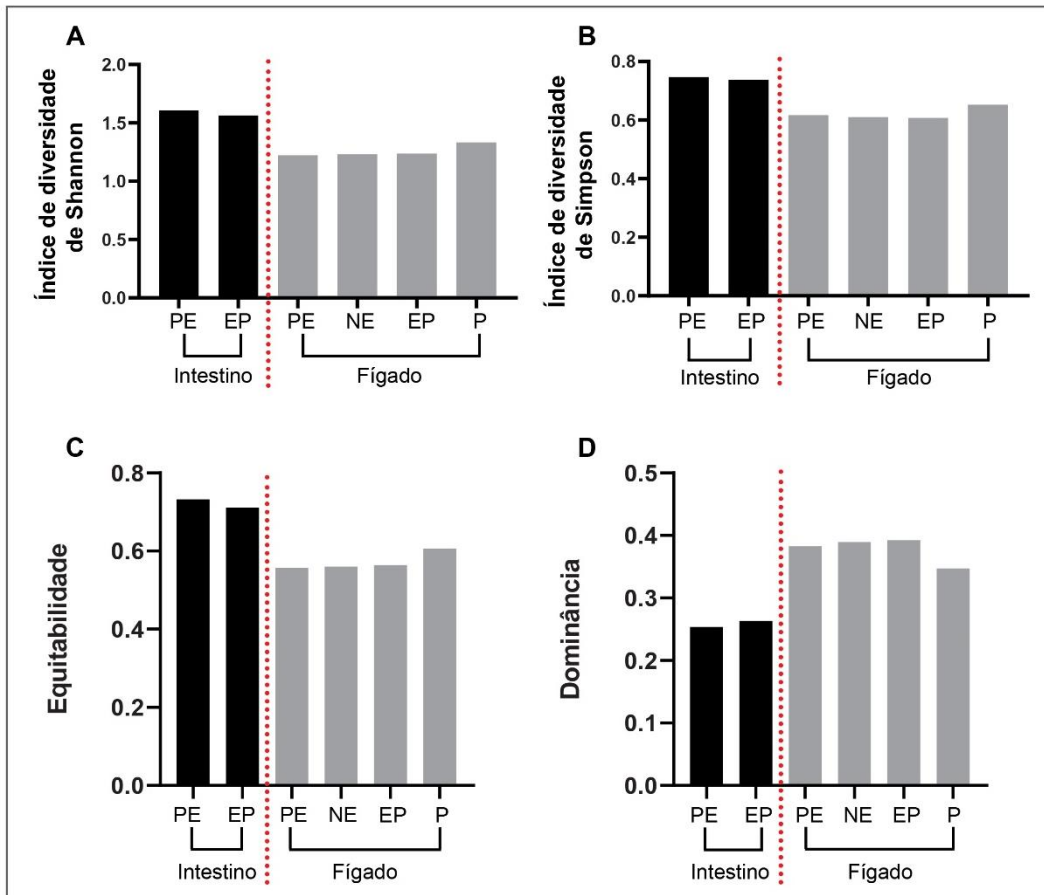


Figura 8: Análises de diversidade aplicadas nos granulomas nos diferentes órgãos-alvo. (A) Índice de diversidade de Shannon. (B) Índice de diversidade de Simpon. (C) Análise de equitabilidae. (D) Análise de dominância.

9.6 Populações celulares estabelecem íntima interação nos granulomas

Nós investigamos qualitativamente, a nível ultraestrutural, a interação entre as populações de células inflamatórias nos granulomas. A população de eosinófilos estabelece íntima relação com as populações de macrófagos epitelióides, plasmócitos e linfócitos (Figura 9 A) e também com neutrófilos (Figura 9 B).

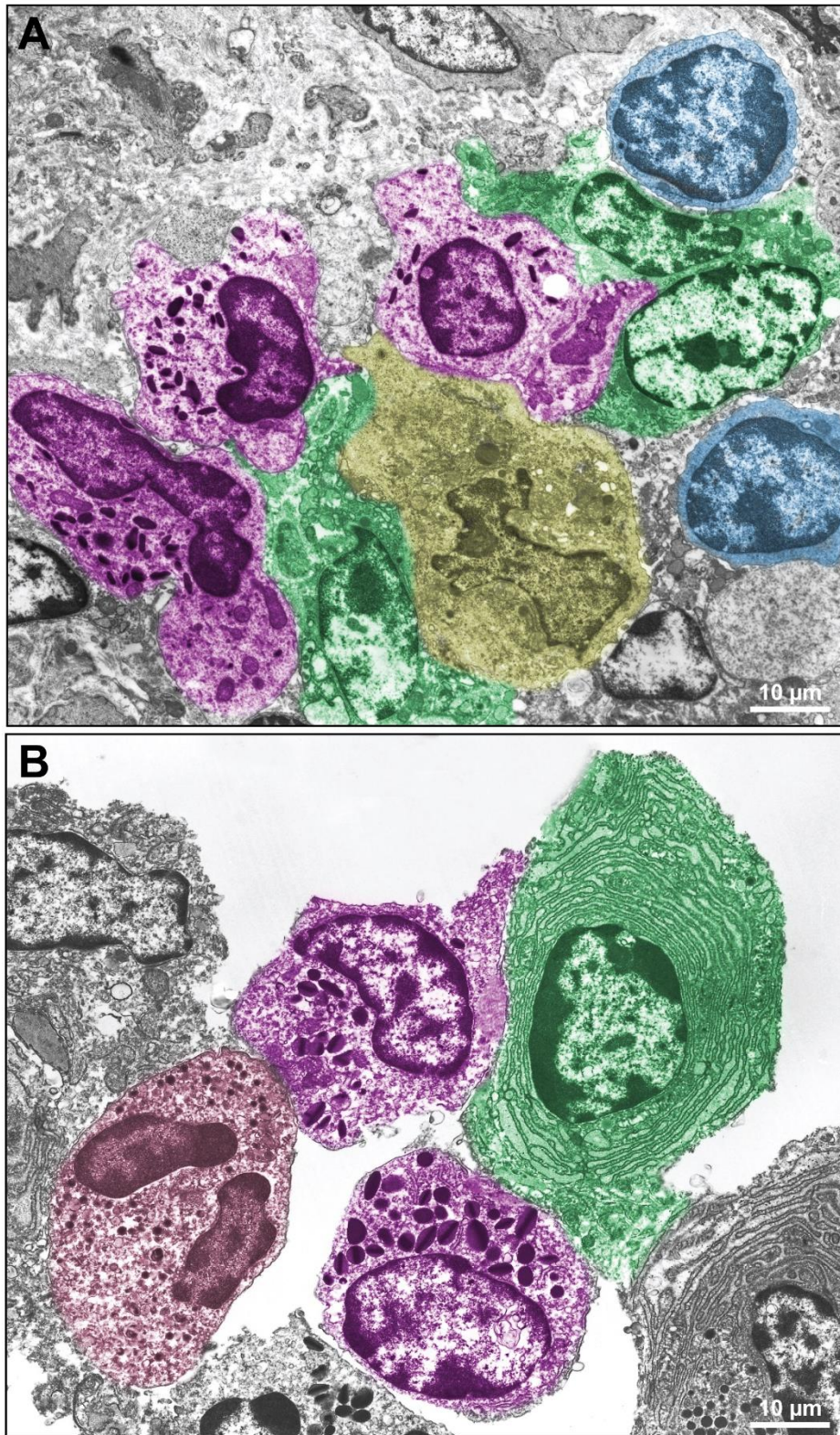


Figura 9: Interação física entre diferentes populações celulares em granuloma. (A) Interação entre eosinófilos (roxo), plasmócitos (verde), macrófago (amarelo) e linfócitos (azul). (B) Interações entre neutrófilo (vermelho), eosinófilos (roxo) e plasmócito (verde). Micrografias eletrônicas foram coloridas artificialmente.

10 DISCUSSÃO

O Granuloma esquistosomótico pode ser entendido como um verdadeiro ecossistema, uma vez que é composto por uma diversa e integrada comunidade celular capaz de construir esta estrutura espaço-temporal através de um processo evolutivo sucessional (MALTA; SILVA; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2021). Nesse processo, o conhecimento das populações celulares e suas interações se mostram essenciais para a construção do ecossistema granuloma.

Inicialmente, ao avaliar por WSI o fígado e intestino grosso dos animais infectados, foi observado maior número de granulomas hepáticos do que intestinais, e que as maiores áreas dos granulomas são encontradas nos granulomas hepáticos. Além disso, foram encontrados granulomas apresentando características morfológicas distintas representando os diferentes estágios evolutivos desta estrutura (Figura 3). É reconhecido que cada granuloma representa um sistema dinâmico evolutivo partindo de um estágio imaturo (PE) para um estágio maduro (NE, EP) e posteriormente para um estágio involucional (P) (AMARAL; SILVA; DIAS; MALTA *et al.*, 2017; LENZI; KIMMEL; SCHECHTMAN; PELAJO-MACHADO *et al.*, 1998). Considerando fígado e intestino, em conjunto, foram encontrados desde granulomas em estágios mais iniciais (PE) caracterizado pelo influxo e rearranjo de células ao entorno do ovo até estágios fibróticos mais tardios (P) de formação. Entretanto, no fígado foram encontrados todos os quatro estágios evolutivos clássicos (PE, NE, EP e P), enquanto no intestino grosso apenas foram observados granulomas nos estágios PE e EP. Este fato está em acordo observações anteriores do nosso grupo de pesquisa que mostraram que a formação de granulomas em diferentes órgãos-alvo, intestinos e fígado, apresenta características específicas para cada órgão (AMARAL; SILVA; DIAS; MALTA *et al.*, 2017).

Dentre os granulomas do fígado, os EP foram mais numerosos e os NE maiores, ao passo que não houve diferenças no fígado quando comparados quantidade ou tamanho dos granulomas no intestino. Em infecções natural e experimental, granulomas produtivos ricos em colágeno são formados no fígado, isso se deve a incapacidade do organismo hospedeiro em eliminar ovos que ficam presos no tecido hepático, ao contrário do que ocorre no intestino, em que os granulomas se apresentam mais organizados e com menos fibras colágenas (AMARAL; SILVA; DIAS; MALTA *et al.*, 2017; AMARAL; SILVA; MALTA; CARMO *et al.*, 2016). Uma característica notável do granuloma hepático é sua função protetora para encapsular as secreções hepatotóxicas do ovo (HAMS; AVIELLO;

FALLON, 2013). Já granulomas intestinais são estruturas móveis capazes de transportar os ovos do parasito para o lúmen intestinal, a fim de eliminá-los juntamente com as fezes do hospedeiro vertebrado (SCHWARTZ; FALLON, 2018). Granulomas hepáticos apresentam, principalmente em granulomas EP, diferentes padrões de produção e deposição de componentes de matriz extracelular como colágenos intersticiais I e III, tenascina, vitronectina, proteoglicanos, hialurano e fibras elásticas (LENZI; ROMANHA; SANTOS; ROSAS *et al.*, 2006). Granulomas intestinais e hepáticos possuem composição de matriz extracelular diferentes. Granulomas crônicos (P) são ricos em colágeno, estrutura rígida. Tais estágios granulomatosos não são encontrados em granulomas intestinais pois a liberação do ovo ocorre antes dessa modulação. Recentemente, foi descoberto que os ovos liberam substâncias capazes de decompor fibronectina, que é um conteúdo de matriz extracelular inicialmente depositado (WANG; DA'DARA; SKELLY, 2017). E essa degradação pode modular a dinâmica de formação do granuloma nos diferentes órgãos modulando também a dinâmica da comunidade celular (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

A colonização do tecido por células inflamatórias para formar granulomas pode ser explicada do ponto de vista de uma sucessão ecológica em que uma comunidade é capaz de modificar seu ambiente físico, criando condições e recursos para a construção de um ecossistema (MALTA; SILVA; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2021). Para caracterização da comunidade de células dos granulomas hepáticos e intestinais, foram identificadas diferentes populações celulares com base em características morfológicas fenotípicas distintas entre si.

Vale ressaltar que a identificação, classificação e quantificação dos granulomas e das populações celulares só foi possível pelo escaneamento digital das lâminas histológicas inteiras. Esta técnica, o WSI, permite a criação de uma imagem digital de alta resolução do corte histológico inteiro e posterior análise de toda a área do corte dos tecidos. Esta técnica vem sendo cada vez mais utilizada para diferentes contextos de estudo, pois permite a avaliação precisa das características citológicas de diferentes tecidos e aspectos morfológicos associados a diferentes patologias (AL-JANABI; HUISMAN; VAN DIEST, 2012; CORNISH; SWAPP; KAPLAN, 2012; FÓNYAD; KRENÁCS; NAGY; ZALATNAI *et al.*, 2012; KAWANO; HIGGINS; YAMAMOTO; NYHUS *et al.*, 2013). Inclusive a aplicação de WSI pode melhorar a avaliação e quantificação de múltiplos parâmetros histológicos em diferentes condições hepáticas

como as produzidas pela esquistossomose (MELO; RAAS; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2020).

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 4). 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 (Figura 3B), além de uma análise quantitativa precisa sobre esses aspectos. Existem diferentes estudos e para o diagnóstico preciso na identificação de células e tecidos e suas características histopatológicas associadas. Em estudos anteriores, o WSI já se mostrou uma ferramenta confiável para avaliação dos estágios de distribuição, tamanho e evolução dos granulomas causados por *S. mansoni* em grandes áreas de tecidos (AMARAL; SILVA; DIAS; MALTA *et al.*, 2017; AMARAL; SILVA; MALTA; CARMO *et al.*, 2016; DIAS; AMARAL; MALTA; SILVA *et al.*, 2018; MELO; RAAS; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2020).

Populações ecológicas são conjuntos de indivíduos que apresentam características e até mesmo funções semelhantes (ODUM; BARRET, 2007). Os diferentes tipos celulares encontrados nos granulomas representam a diversidade de populações de células inflamatórias que compõem este ecossistema com nichos específicos e papéis distintos na manutenção/funcionamento destas estruturas (MALTA; SILVA; PALAZZI; NEVES *et al.*, 2021). Investigamos o número médio de células em cada estágio evolutivo e, em seguida, também a abundância proporcional das populações celulares nos diferentes estágios evolutivos dos granulomas dos órgãos-alvo. As populações de macrófagos epitelióides e eosinófilos foram as mais abundantes nos granulomas tanto intestinal quanto hepático. Já as populações de células gigantes e plasmócitos foram as menos abundantes. Os granulomas, em geral, não são tipicamente compostos de tipos de células em igual abundância e essa composição pode mudar ao longo do tempo (LENZI; KIMMEL; SCHECHTMAN; PELAJO-MACHADO *et al.*, 1998; LENZI; ROMANHA; PELAJO-MACHADO, 2004). Desta forma, confirmamos que verdadeiramente as células do granuloma podem se comportar de forma semelhante às espécies de uma comunidade, onde há espécies “comuns” abundantes e outras espécies “raras” (ODUM; BARRET, 2007). Os macrófagos e eosinófilos foram as populações

celulares mais comuns, enquanto células gigantes e plasmócitos foram as mais raras. De fato é reportado que granulomas em diversas doenças, como tuberculose, são constituídos principalmente por macrófagos, principalmente epitelióides e células gigantes e na infecção por *S. mansoni*, por eosinófilos (ARIYARATNE; FINNEY, 2019; CHUAH; JONES; BURKE; MCMANUS *et al.*, 2014; PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018).

Investigamos também a dinâmica das populações celulares ao longo do tempo nos granulomas hepáticos e intestinais. Observamos que algumas populações celulares apresentam comportamentos opostos. Enquanto a proporção de macrófagos epitelióides e mononucleares aumentam a partir do estágio PE e se mantem constante as populações de eosinófilos e linfócitos diminuem e se mantêm constante em granulomas hepáticos. O aumento de fibroblastos foi gradativo nos granulomas dos diferentes órgãos, o que faz sentido visto, já que ao longo do tempo a deposição da matriz extracelular por fibroblastos, miofibroblastos e células hepáticas estreladas (presentes apenas nos granulomas hepáticos) aumenta, o que caracteriza o aumento da abundância e do papel funcional dessas populações (LENZI; ROMANHA; SANTOS; ROSAS *et al.*, 2006).

Para avaliar a composição da comunidade do granuloma, aplicamos ferramentas de análises ecológicas comumente usadas para avaliação clássica na descrição da estrutura da comunidade em ecossistemas de maior escala. A estrutura da comunidade é essencialmente a composição de uma comunidade, incluindo o número de espécies nela encontrada e seus números relativos (ODUM; BARRET, 2007). Além da abundância proporcional, foram avaliadas a riqueza, a similaridades, a diversidade, a dominância e a equitabilidade.

Granulomas apresentaram riqueza igual a 9 populações celulares. Todas as populações foram encontradas em todos os estágios evolutivos, mas a abundância proporcional das mesmas se modificou ao longo do tempo. O que também ocorre na dinâmica de comunidades em maior escala (KREBS, 1989; ODUM; BARRET, 2007). Quando avaliamos a densidade das populações celulares nos dois órgãos, observamos um comportamento semelhante ao da abundância proporcional das populações celulares. Observamos flutuações na densidade das populações celulares. Nos granulomas hepáticos, houve aumento significativo da população de fibroblastos, o que também ocorreu em granulomas intestinais. Isso é importante pois a tendência dos granulomas ao longo do tempo é ter sua matriz extracelular depositada e organizada, conferindo aspecto arredondado a essa estrutura ao longo do tempo. E a população de fibroblastos é uma das

principais responsáveis por esse processo (LENZI; KIMMEL; SCHECHTMAN; PELAJO-MACHADO *et al.*, 1999; LUKACS; CHENSUE; SMITH; STRIETER *et al.*, 1994; WYLER; TRACY, 1982).

A análise de densidade considera o número de populações celulares por área de granuloma (MAGURRAN, 2011). Além disso, no intestino observamos que a densidade de eosinófilos, linfócitos granulócitos, plasmócitos e gigantes diminuem estatisticamente. Apenas a densidade de macrófagos epitelióides e mononucleares se mantêm ao longo do tempo em granulomas intestinais. Já nos granulomas hepáticos, a densidade de eosinófilos, macrófagos epitelióides, linfócitos, plasmócito e fibroblastos se modifica ao longo do tempo, já a densidade de mononucleares, granulócitos e células gigantes não se modifica. Tais variações mostram que granulomas de diferentes órgãos apresentam dinâmicas diferentes. E que provavelmente isso é refletido nas possíveis diferentes funções das mesmas populações celulares nos diferentes órgãos.

A análise de similaridade agrupa comunidades que apresentam composição semelhantes, no quesito riqueza e abundância de espécies (MAGURRAN, 2011; WHITTAKER; LEVIN; ROOT, 1973). Ao fazermos a análise de similaridades, esperávamos que a comunidade de granulomas de mesmo estágio evolutivo em diferentes órgãos-alvo seria mais semelhante, pois os critérios morfológicos para avaliá-los são os mesmos. Surpreendentemente, granulomas de diferentes estágios do mesmo órgão são mais semelhantes. O que faz sentido, visto que estamos analisando a dinâmica temporal de modificação dos granulomas, por essa razão granulomas intestinais são mais semelhantes entre si e hepáticos nos estágios NE, EP e P também, apenas o granuloma PE hepático possui comunidade celular muito diferente dos outros estágios evolutivos dos granulomas nesse mesmo órgão. O aporte inicial de eosinófilos para os granulomas hepáticos foi maior que no intestino. O intestino é um órgão que apresenta diversas populações celulares inflamatórias residentes, como eosinófilos e plasmócitos, em condições sem infecção (MASTERSON; MENARD-KATCHER; LARSEN; FURUTA *et al.*, 2021). Desta forma, tais células podem responder rapidamente a presença dos ovos do parasito, o que não ocorre no fígado. Apesar de aspectos de como os ovos do parasito são liberados no lúmen intestinal precisa ser melhor compreendidos, já se sabe que quando encontrados nas fezes de humanos ou animais infectados, são desprovidos de um granuloma encapsulado, sugerindo que o ovo deixa o granuloma ao entrar na matéria fecal (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

A diversidade é a relação da riqueza de espécies e a abundância relativa de espécies no tempo e no espaço (HUBBEL, 2001). É uma relação entre o número de espécies e da quantidade de indivíduos dentro da comunidade. Portanto, são considerados aspectos como a riqueza, a abundância e a uniformidade e como as espécies estão distribuídas dentro dessas comunidades. Nossas análises mostraram que as comunidades com maiores índices de diversidade são as dos granulomas intestinais. Tanto no índice de Shannon, que oferece um peso maior para as espécies raras, quanto no índice de Simpson, que considera as espécies comuns. O conceito de distribuição uniforme (equitabilidade) de abundância de indivíduos uma espécie dentro de uma comunidade, trazem a relação de uniformidade e dominância (MAGURRAN, 2011). Algumas espécies tem abundâncias muito maiores que outras, como as populações de macrófagos epitelióides e eosinófilos. Quanto maior a uniformidade, quanto mais equilibrado for a distribuição de indivíduos de uma espécie dentro de uma comunidade maior o índice de diversidade. Duas áreas com a mesma quantidade de espécies, mas com graus de dominância e uniformidade diferentes, apresentarão diversidade diferentes. A área que apresenta maior índice de diversidade é aquela com maior uniformidade e menor taxa de dominância entre as espécies, como ocorreu nos granulomas intestinais. Já nos granulomas hepáticos, o estágio de maior diversidade foi o estágio produtivo. Na natureza, os índices de diversidade são importantes para indicar áreas para proteção ambiental, de acordo com a composição de sua comunidade, a presença de espécies raras em uma comunidade a elege como área prioritária para conservação. Espécies raras são aquelas pouco abundantes e sensíveis a mudanças ambientais. Nos granulomas também são encontradas populações celulares raras, plasmócitos e gigantes. A função para essas populações celulares nos granulomas precisa ser melhor investigada.

Interessantemente, através da microscopia eletrônica de transmissão, detectamos a interação física entre diversas populações celulares. As interações entre eosinófilos e plasmócitos foram bastante frequentes, o que nos chamou bastante atenção. Conforme mencionado anteriormente, eosinófilos e plasmócitos constituem populações celulares com diferentes proporções de abundância podendo serem consideradas, comum e rara, respectivamente. Tanto o papel funcional dessas células, quanto dessa interação no contexto dos granulomas ainda é pouco conhecido. É sabido que essa interação é importante em diversos outros microambientes. Eosinófilos são responsáveis por promover a longa vida de plasmócitos na medula óssea e a secreção de imunoglobulina

A por plasmócitos no epitélio intestinal (CHU; BELLER; RAUSCH; STRANDMARK *et al.*, 2014; CHU; FRÖHLICH; STEINHAUSER; SCHEEL *et al.*, 2011). Eosinófilos são importantes por promoverem a amplificação e o estabelecimento da resposta Th2 e uma resposta regulatória nos granulomas hepáticos, além de ser capaz de liberar proteínas catiônicas fatais para o parasito *S. mansoni* (DE OLIVEIRA; RODRIGUES; MOREIRA; RODRIGUES *et al.*, 2022; JAMES; COLLEY, 1976). No entanto a função de plasmócitos e suas interações nos granulomas, tanto hepático quanto intestinal precisa ser melhor elucidada.

Em conjunto, os dados do presente trabalho apontam que a formação dos granulomas durante a esquistossomose mansônica é dinâmica e a abundância das populações celulares se modifica ao longo do tempo. Ao aplicar estratégias clássicas da ecologia, detectamos que durante o processo de evolução dos granulomas intestinais e hepáticos, a riqueza (número de populações) se mantém, mas as abundâncias proporcionais flutuam. Nesse contexto, se faz importante a investigação dos fatores que regulam as abundâncias das populações celulares durante a construção dos granulomas e quais interações as populações celulares inflamatórias estabelecem e quais os papéis funcionais essas interações desencadeiam para o funcionamento do granuloma. Esse conhecimento pode ser a chave para entender a complexidade dessa resposta e apontar novos alvos terapêuticos.

11 CONCLUSÕES

Utilizar a perspectiva da ecologia celular para entender a dinâmica de formação dos granulomas na esquistossomose mansônica amplia o entendimento da dinâmica das populações durante a construção desse ecossistema. Ao aplicar ferramentas ecológicas clássicas para o entendimento da estrutura da comunidade celular de granulomas intestinais e hepáticos, descobrimos que tais estruturas são diferentes e independentes. A riqueza das populações celulares foi a mesma em todos os estágios evolutivos dos granulomas nos diferentes órgãos alvo, mas a abundância das mesmas variou ao longo do tempo. A densidade das populações celulares se comporta de maneira semelhante à abundância. Granulomas intestinais apresentaram maiores índices de diversidade, ou seja, apresentam populações celulares com abundâncias proporcionais mais uniformes e conseqüentemente menor dominância. Granulomas do mesmo órgão em diferentes

estágios evolutivos são mais semelhantes que granulomas de mesmo estágio evolutivo de diferentes órgãos. Além disso, identificamos interações celulares físicas que podem ser importantes para a dinâmica de formação e regulação do granuloma. Tais aspectos devem ser considerados em investigações futuras visando abordagens funcionais dos granulomas.

O presente trabalho ressalta a aplicação da ecologia celular para o melhor entendimento do granuloma esquistossomótico como uma estrutura que funciona como um ecossistema. O melhor entendimento do granuloma esquistossomótico como um sistema ecológico pode ser a chave para desvendar a complexidade dessa resposta inflamatória e apontar novos alvos terapêuticos.

12 REFERÊNCIAS

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

AMARAL, K. B.; SILVA, T. P.; DIAS, F. F.; MALTA, K. K. *et al.* Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. **PloS one**, 12, n. 9, p. e0184696, 2017.

AMARAL, K. B.; SILVA, T. P.; MALTA, K. K.; CARMO, L. A. S. *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**, 11, n. 11, p. e0166979, 2016.

ARIYARATNE, A.; FINNEY, C. A. Eosinophils and Macrophages within the Th2-Induced Granuloma: Balancing Killing and Healing in a Tight Space. **Infection and immunity**, 87, n. 10, p. e00127-00119, 2019.

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**, 31, n. 6, p. 1168-1180, 1982.

CHU, V. T.; BELLER, A.; RAUSCH, S.; STRANDMARK, J. *et al.* Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. **Immunity**, 40, n. 4, p. 582-593, 2014.

CHU, V. T.; BEREK, C. Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. **European journal of immunology**, 42, n. 1, p. 130-137, 2012.

CHU, V. T.; FRÖHLICH, A.; STEINHAUSER, G.; SCHEEL, T. *et al.* Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. **Nature immunology**, 12, n. 2, p. 151-159, 2011.

CHUAH, C.; JONES, M. K.; BURKE, M. L.; MCMANUS, D. P. *et al.* Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in parasitology**, 30, n. 3, p. 141-150, 2014.

CORNISH, T. C.; SWAPP, R. E.; KAPLAN, K. J. Whole-slide imaging: routine pathologic diagnosis. **Advances in anatomic pathology**, 19, n. 3, p. 152-159, 2012.

DE OLIVEIRA, V. G.; RODRIGUES, V. F.; MOREIRA, J. M. P.; RODRIGUES, J. L. *et al.* Eosinophils participate in modulation of liver immune response and tissue damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Cytokine**, 149, n. 155701, p. 155701, 2022.

DIAS, F. F.; AMARAL, K. B.; MALTA, K. K.; SILVA, T. P. *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**, 9, p. 3019, 2018.

FÓNYAD, L.; KRENÁCS, T.; NAGY, P.; ZALATNAI, A. *et al.* Validation of diagnostic accuracy using digital slides in routine histopathology. **Diagnostic pathology**, 7, n. 1, p. 1-7, 2012.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **The Lancet**, 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics softwares package for education and data analysis. Versão 4.03. **Paleontologia Electronica** 4, n. 1, p. 9, 2001.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The schistosoma granuloma: friend or foe? **Frontiers in immunology**, 4, p. 89, 2013.

HSÜ, S. L.; HSÜ, H. F.; DAVIS, J. R.; LUST, G. L. 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**, 66, n. 1, p. 89-97, 1972.

HSÜ, S. Y. L.; HSÜ, H. F.; LUST, G. L.; DAVIS, J. R. *et al.* Comparative studies on the lesions caused by eggs of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in the liver of hamsters, guinea pigs, and albino rats. **Annals of tropical medicine parasitology** 67, n. 3, p. 349-356, 1973.

HUBBEL, S. P. **The unified neutral theory of biodiversity and biogeography**. New Jersey: 2001. 369 p. (Princeton).

JAMES, S. L.; COLLEY, D. G. Eosinophil-mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. **Journal of the reticuloendothelial society**, 20, n. 5, p. 359-374, 1976.

KAREVA, I. What can ecology teach us about cancer? **Translational oncology**, 4, n. 5, p. 266-270, 2011.

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

KAWANO, Y.; HIGGINS, C.; YAMAMOTO, Y.; NYHUS, J. *et al.* Darkfield adapter for whole slide imaging: adapting a darkfield internal reflection illumination system to extend WSI applications. **PloS one**, 8, n. 3, p. e58344, 2013.

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

LACINA, L.; KODET, O.; DVOŘÁNKOVÁ, B.; SZABO, P. *et al.* Ecology of melanoma cell. **Histology and histopathology**, p. 247-254, 2018.

LENZI, H. L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M. *et al.* Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, 93, n. 1, p. 141-151, 1998.

LENZI, H. L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M. *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**, 32, n. 5, p. 639-643, 1999.

LENZI, H. L.; ROMANHA, W. S. **Schistosomal granuloma is like a small multicellular organism that operates as a complex system**. 2003. (Second Brazilian Symposium on Mathematical and Computational Biology).

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.; ROMANHA, W. S.; SANTOS, R. M.; ROSAS, A. *et al.* Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: fractal arrangement, internal regulation, autopoietic component and closure. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, 101, n. 1, p. 219-231, 2006.

LUKACS, N. W.; CHENSUE, S. W.; SMITH, R. E.; STRIETER, R. M. *et al.* Production of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha by inflammatory granuloma fibroblasts. **The american journal of pathology**, 144, n. 4, p. 711, 1994.

MAGURRAN, A. E. Medindo a diversidade biológica. **Curitiba: Editora da UFPR**, 261, 2011.

MALTA, K. K.; SILVA, T. P.; PALAZZI, C.; NEVES, V. H. *et al.* Changing our view of the *Schistosoma* granuloma to an ecological standpoint. **Biological reviews**, 2021.

MASTERSON, J. C.; MENARD-KATCHER, C.; LARSEN, L. D.; FURUTA, G. T. *et al.* Heterogeneity of intestinal tissue eosinophils: Potential considerations for next-generation eosinophil-targeting strategies. **Cells**, 10, n. 2, p. 426, 2021.

MCMANUS, D. P.; BERGQUIST, R.; CAI, P.; RANASINGHE, S. *et al.* Schistosomiasis-from immunopathology to vaccines. **Seminars in immunopathology**, 42, n. 3, p. 355-371, Jun 2020.

MCMANUS, D. P.; DUNNE, D. W.; SACKO, M.; UTZINGER, J. *et al.* Schistosomiasis. **Nature reviews disease primers**, 13, n. 4, p. 1-19, 2018.

MELO, R. C. N.; RAAS, M. W. D.; PALAZZI, C.; NEVES, V. H. *et al.* Whole Slide Imaging and Its Applications to Histopathological Studies of Liver Disorders. **Frontiers in Medicine**, 6, 2020

MELO, R. C. N.; ROSA, P. G.; NOYMA, N. P.; PEREIRA, W. F. *et al.* Histological approaches for high-quality imaging of zooplanktonic organisms. **Micron**, 38, n. 7, p. 714-721, 2007.

ODUM, E.; BARRET, G. W. **Fundamentos de ecologia** 2007. (Thomson, São Paulo.

PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. The formation and function of granulomas. **Annual review of immunology**, 36, p. 639-665, 2018.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. Schistosoma "Eggs-Iting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Frontiers in immunology**, 9, p. 2492, 2018.

TAKAKI, K. K.; RINALDI, G.; BERRIMAN, M.; PAGÁN, A. J. *et al.* *Schistosoma mansoni* eggs modulate the timing of granuloma formation to promote transmission. **Cell host microbe**, 29, n. 1, p. 58-67. e55, 2021.

WANG, Q.; DA'DARA, A. A.; SKELLY, P. J. The human blood parasite *Schistosoma mansoni* expresses extracellular tegumental calpains that cleave the blood clotting protein fibronectin. **Scientific reports**, 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

WEINSTOCK, J. V.; BOROS, D. L. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with *Schistosomiasis mansoni*. **The journal of immunology**, 130, n. 1, p. 418-422, 1983.

WHITTAKER, R. H.; LEVIN, S. A.; ROOT, R. B. Niche, habitat, and ecotope. **The american naturalist**, 107, n. 955, p. 321-338, 1973.

WHO. Schistosomiasis: progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020. : Department of Control of Neglected Tropical Diseases Geneva, Switzerland: 74 p. 2011.

WYLER, D. J.; TRACY, J. W. Direct and indirect effects of soluble extracts of *Schistosoma mansoni* eggs on fibroblast proliferation in vitro. **Infection and immunity**, 38, n. 1, p. 103-108, 1982.