

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

Yasmin Moreira Vieira de Aguiar

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE EOSINÓFILOS NO MICROAMBIENTE DA
INFLAMAÇÃO GRANULOMATOSA INTESTINAL DURANTE A INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *SCHISTOSOMA MANSONI***

Belo Horizonte

2026

Yasmin Moreira Vieira de Aguiar

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE EOSINÓFILOS NO MICROAMBIENTE DA
INFLAMAÇÃO GRANULOMATOSA INTESTINAL DURANTE A INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *SCHISTOSOMA MANSONI***

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Rossana Correa Netto de Melo

Coorientadora: Dra. Kássia Karoline Malta Oliveira

Belo Horizonte

2026

043

Aguiar, Yasmin Moreira Vieira de.

Distribuição espacial de eosinófilos no microambiente da inflamação granulomatosa intestinal durante a infecção experimental por *Schistosoma mansoni* [manuscrito] / Yasmin Moreira Vieira de Aguiar. – 2026.

89 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Rossana Correa Netto de Melo. Coorientadora: Dra. Kássia Karoline Malta Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Eosinófilos. 3. Granuloma. 4. Intestinos. 5. Esquistossomose mansoni. 6. Inflamação. I. Melo, Rossana Correa Netto de. II. Oliveira, Kássia Karoline Malta. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR - SECRETARIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
YASMIN MOREIRA VIEIRA DE AGUIAR

Às quatorze horas do dia 26 de fevereiro de 2026, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE EOSINÓFILOS NO MICROAMBIENTE DA INFLAMAÇÃO GRANULOMATOSA INTESTINAL DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR SCHISTOSOMA MANSONI", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Dra. Rossana Correa Netto de Melo, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Rossana Correa Netto de Melo	UFJF	Aprovada
Dra. Kássia Karoline Malta Oliveira	UFJF	Aprovada
Dra. Cláudia Rocha Carvalho	UFMG	Aprovada
Dra. Daisy Woellner Santos	INSTITUTO BUTANTAN	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2026.

Dra. Rossana Correa Netto de Melo _____

Dra. Kássia Karoline Malta Oliveira _____

Dra. Cláudia Rocha Carvalho _____

Dra. Daisy Woellner Santos _____

Belo Horizonte, 03 de março de 2026.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Documento assinado eletronicamente por **Claudia Rocha Carvalho, Professora do Magistério Superior**, em 03/03/2026, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com



fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rossana Correa Netto de Melo, Usuário Externo**, em 04/03/2026, às 10:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daisy Woellner Santos, Usuária Externa**, em 05/03/2026, às 13:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kássia Karoline Malta Oliveira, Usuária Externa**, em 13/03/2026, às 17:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4994943** e o código CRC **112ACCB**.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação foi um esforço conjunto, pois não se faz ciência sem colaboração. Agradeço à todas e todos que, de alguma forma, fizeram parte desse processo.

Agradeço profundamente à minha família por todo o apoio e suporte que sempre me foi dado, em especial aos meus pais, Dhébora Moreira e Rafael Vieira, e aos meus irmãos, Tiago Vieira e Aurora Moreira, que me ancoraram nesse processo.

Agradeço aos meus amigos e a todos os membros do meu laboratório e colaboradores. Em especial, expresso minha gratidão à minha orientadora, Dra. Rossana Melo, pela oportunidade e confiança no meu trabalho. À minha coorientadora, Dra. Kássia Malta, pela amizade e pelo suporte desde o início. E aos meus amigos de laboratório, em especial Dr. Thiago Silva, Dr. Vitor Neves, Dra. Cinthia Palazzi, Felipe Kneip, Pedro Henrique e Júlia Almeida, que estiveram ativamente presentes na elaboração deste trabalho.

Estendo meus agradecimentos e profunda gratidão às colaborações feitas no Rio de Janeiro, em especial ao Dr. Bruno Vieira que foi essencial na viabilização dos experimentos que permitiram que este trabalho fosse executado.

Expresso minha profunda gratidão a todos que tornaram possível esta dissertação.

“Em algum lugar, algo incrível está
esperando para ser descoberto.”

Carl Sagan

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Celular (LBC) do Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob orientação da Dra. Rossana Correa Netto de Melo e coorientação da Dra. Kássia Karoline Malta de Oliveira, com financiamento das seguintes agências de fomento:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Cnpq

Também contou com o apoio e colaboração dos seguintes laboratórios/Centros/Instituições e pesquisadores:

Laboratório de Medicina Experimental e Saúde da Fiocruz, RJ.

Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Vacinas Anti-Helmínticas da Fiocruz, RJ.

Laboratório Integrado de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFJF, MG.

RESUMO

Eosinófilos são células multifuncionais com importante papel em doenças parasitárias, como a esquistossomose - uma doença tropical negligenciada que possui como histopatologia marcante a formação de granulomas em órgãos-alvo, fígado e intestino. Granulomas são estruturas dinâmicas formadas por um aglomerado de células imunes dispostas ao redor do ovo do parasito, fortemente associados ao aprisionamento do ovo no fígado e associados à translocação dos ovos através da parede no intestino. Tem-se estabelecido que no fígado, os eosinófilos colonizam robustamente os granulomas esquistossomóticos e ocupam um nicho ecológico na periferia desse microambiente. Entretanto, ainda é pouco compreendido a distribuição espacial de eosinófilos nos granulomas intestinais. No presente trabalho, realizou-se o mapeamento dos diferentes estágios da inflamação granulomatosa e distribuição espacial de eosinófilos no intestino como um todo durante a infecção murina. Com aplicação de um conjunto de metodologias que incluem técnicas histopatológicas, imunofluorescência e citometria de fluxo, e análises de imagens por *Whole Slide Imaging*, os resultados indicaram que o intestino delgado é mais acometido por granulomas que o intestino grosso. Com granulomas preferencialmente na submucosa e com predominância do estágio pré-granulomatoso exsudativo (PE). Os eosinófilos colonizam robustamente granulomas PE em todo o intestino, e sua população diminui ao longo dos estágios. Em granulomas maduros, os eosinófilos são organizados espacialmente e ocupam um nicho medial-periférico, com presença de eosinófilos imaturos e maduros, onde compartimentalizam sua proteína catiônica. Durante a infecção, diferentes subpopulações de eosinófilos são encontradas no intestino, indicando modulação da resposta inflamatória. Os achados avançam no entendimento das funcionalidades dos granulomas e dos eosinófilos durante a esquistossomose mansoni.

Palavras-chave: Eosinófilos; Granulomas; Intestino; Esquistossomose mansoni; inflamação; Histopatologia; *Whole Slide Imaging* (WSI).

ABSTRACT

Eosinophils are multifunctional cells with an important role in parasitic diseases, such as schistosomiasis mansoni—a neglected tropical disease caused by the parasite *Schistosoma mansoni*. One of the main pathological characteristics of the disease is the formation of granulomas in target organs, such as the liver and intestines. Granulomas are dynamic structures formed by a cluster of immune cells arranged around the parasite's egg, associated with the translocation of eggs through the intestinal wall and their entrapment in the liver. In liver infection, eosinophils robustly colonize schistosoma granulomas and occupy an ecological niche at the periphery of this microenvironment. However, little is known about the spatial distribution of eosinophils in intestinal granulomas. In this study, we mapped granulomatous inflammation and the spatial distribution of eosinophils in granulomas throughout the intestinal tract of mice with acute *S. mansoni* infection. Using a set of methodologies including histopathological techniques, immunofluorescence, flow cytometry, Whole Slide Imaging, and quantitative image analysis, the results demonstrated that the small intestine (SI) is more affected by granulomatous inflammation compared to the large intestine (LI). With granulomas preferentially present in the submucosa, a predominance of a more immature granuloma stage (pre-granulomatous exudative /PE) was shown throughout the intestinal tract. This reveals a characteristic dynamic of intestinal granulomas, probably favoring the translocation of parasite eggs. Eosinophils intensely colonize PE granulomas, but in mature granulomas, they are spatially organized and predominantly occupy a medial-peripheral niche. Within this ecological niche, there is a presence of both mature and immature eosinophil populations and compartmentalization of the cationic protein MBP-1, one of the main products of eosinophils. During infection, different eosinophil subpopulations are found in the intestine, indicating modulation of the inflammatory response. Our results, demonstrating an ecological niche of eosinophils, unrelated to parasite eggs, do not favor a direct role of these cells against the parasite. The findings advance the understanding of the functionalities of granulomas and eosinophils during intestinal schistosomiasis mansoni.

Keywords: Eosinophils; Granulomas; Intestine; Schistosomiasis mansoni; inflammation; Histopathology; Whole Slide Imaging (WSI)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da Esquistossomose no mundo.....	19
Figura 2: Distribuição, classificação endêmica e perfil demográfico para esquistossomose mansoni no Brasil, no período de 2010 à 2023.....	21
Figura 3: Incidência da esquistossomose mansônica no Brasil em 2023.	22
Figura 4: Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	23
Figura 5: Imunopatologia das subpopulações de células T durante a esquistossomose murina.	25
Figura 6: Imagem representativa de (A) um granuloma intestinal de camundongo infectado por <i>S. mansoni</i> e corado por <i>Fast Green & Neutral Red</i>	26
Figura 7: Representação da microarquitetura granulomatosa e suas variações ao longo do tempo..	27
Figura 8: Características ultraestruturais de um eosinófilo humano maduro.	28
Figura 9: Eosinófilos: mediadores e funções.	30
Figura 10: Ultraestrutura de eosinófilos durante a ativação.....	31
Figura 11: Mecanismos de secreção de eosinófilos.	32
Figura 12: Organização histológica geral do tubo digestório.	36
Figura 13: Corte transversal do tubo digestório das porções dos intestinos delgado e grosso: duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto.	37
Figura 14: Coleta e Processamento dos intestinos pela técnica de <i>Swiss Roll</i> – rolinho suíço.	44
Figura 15: Obtenção de secções histológicas.	46
Figura 16: Metodologia para zonação dos granulomas..	49
Figura 17: Distribuição de granulomas ao longo de toda extensão do intestino delgado e grosso.....	54
Figura 18: Distribuição de ovos isolados (sem reação granulomatosa) ao longo de toda extensão do Intestino Delgado (ID) e Grosso (IG).	55
Figura 19: Localização preferencial de granulomas na parede intestinal.....	57
Figura 20: Caracterização dos estágios evolutivos dos granulomas intestinais. (A) Granulomas representativos do momento evolutivo dentro de cada estágio (inicial e tardio). (B) Granulomas representativos de cada estágio evolutivo encontrado no intestino de camundongos Swiss Webster infectados por <i>S. mansoni</i>	59

Figura 21: Frequência dos estágios evolutivos dos granulomas intestinais.....	61
Figura 22: Quantificação de eosinófilos por granuloma.	63
Figura 23: Distribuição espacial de eosinófilos nos granulomas intestinais da fase granulomatosa.	65
Figura 24: Quantificação de MBP de eosinófilos por granuloma.....	67
Figura 25: Distribuição de CD34 em granulomas intestinais.	68
Figura 26: Caracterização do perfil imunológico dos eosinófilos durante a esquistossomose..	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de camundongos por grupo experimental.....	43
Tabela 2: Parâmetros analisados nos intestinos de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i>	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Breg - Células B reguladoras

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

CCL5 - Ligante C-C da Quimiocina 5

CCL11 - Ligante C-C da Quimiocina 11

CCR3 - *Chemokine Receptor CCR3*

CDC - *Centers of Disease Control and Prevention*

EPO - *Eosinophil peroxidase* – Peroxidase eosinofílica

ECP - *Eosinophil cationic protein* – Proteína catiônica de eosinófilos

EDN - *Eosinophil-derived neurotoxin* – Neurotoxina derivada de eosinófilos

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNase – Enzima que degrada DNA

E1 - Eosinófilos de perfil 1

E2 - Eosinófilos de perfil 2

ETose – Morte celular por Etose

EETs - *Eosinophil Extracellular Traps*

EoSVs - *Eosinophil Sombrero Vesicles*

EP - Exsudativo produtivo

FG&NR - *Fast Green e Neutral Red*

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

GALT - Tecido linfoide associado a mucosa

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias

GMA - Glicolmetacrilato

HE - Hematoxilina-Eosina

IFN-g - Interferon gama

Ig - Imunoglobulina

IgA - Imunoglobulina A

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G

IG - Intestino grosso

ID - Intestino delgado

IL - Interleucinas

IL-1R α - Receptor de interleucina 1 α

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 6

IL-6R α - Receptor de interleucina 6 α

IL-10 - Interleucina 10

IL-13 - Interleucina 13

MEC - Matriz extracelular

MET - Microscópio eletrônico de transmissão

MBP - *Major basic protein* – Proteína básica principal

MBP-1 - *Major basic protein 1* – Proteína básica principal 1

NE - Necrótico exsudativo

O.C.T - Compound Tissue-Tek

OMS - Organização Mundial de Saúde

P - Produtivo

PBS - Solução Salina Fosfato Tamponada

PP - Peyer Patches- Placas de Peyer

PE - Pré-granulomatoso exsudativo

PMD - *Piecemeal degranulation* – Desgranulação por piecemeal

PRR - *pattern recognition receptors*

RANTES - *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*

RNase – Enzima que degrada RNA (ácido ribonucleico)

SEA - *Soluble egg antigens* – Antígenos solúveis do ovo

SFB - Soro fetal bovino

SISPCE – Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

Th - Células *T-helper*

Th1- Células *T-helper* do tipo 1

Th2- Células *T-helper* do tipo 2

Th17- Células *T-helper* do tipo 17

TLR - *Toll-like receptor*

TNF-a - Fator de necrose tumoral alfa

Treg - Células T reguladoras

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

WSI - Whole Slide Imaging

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Esquistossomose	19
1.1.1. Aspectos gerais e epidemiológicos	19
1.1.2. Ciclo de vida do parasito <i>S. mansoni</i>	22
1.1.3. Resposta imune no hospedeiro vertebrado	24
1.1.3.1. Imunopatogênese	24
1.1.3.2. Resposta inflamatória granulomatosa	25
1.2. Eosinófilos	27
1.2.1. Aspectos gerais	27
1.2.2. Maturação e ativação	30
1.2.3. Processos de secreção	31
1.2.3.1. Exocitose	32
1.2.3.2. PMD	33
1.2.3.3. Citólise	33
1.2.4. Eosinófilos no contexto da esquistossomose	34
1.3. Intestino	35
1.3.1. Aspectos gerais	35
1.3.2. Características morfológicas	36
1.3.3. Eosinófilos no contexto do intestino	38
1.3.4. Intestino no contexto da esquistossomose	39
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo Geral	42
3.2. Objetivos Específicos	42
4. METODOLOGIA	43
4.1. Modelo de infecção experimental por <i>S. mansoni</i>	43
4.2. Histopatologia:	44
4.2.1. Coleta das amostras biológicas	44
4.2.2. Processamento para histologia	45
4.2.3. Processamento para imunofluorescência	46
4.2.4. Whole Slide Imaging (WSI)	47

4.2.5.Análises morfométricas.....	48
4.2.5.1.Enumeração e classificação de granulomas	48
4.2.5.2.Quantificação de eosinófilos em granulomas	49
4.2.5.3.Análise quantitativa de MBP-1	49
4.3.Citometria	50
4.3.1.Extração de células e Processamento para Citometria	50
4.3.2.Leitura, marcação e análise da Citometria	51
4.4.Análises Estatísticas.....	52
5.RESULTADOS	53
5.1.Mapeamento de granulomas no intestino.....	53
5.1.1.O intestino delgado é o mais acometido pela inflamação granulomatosa	53
5.1.2.Os granulomas estão localizados preferencialmente na submucosa intestinal	56
5.1.3.Granulomas intestinais constituem um sistema evolutivo dinâmico	58
5.1.4.O estágio PE predomina durante a infecção aguda intestinal por <i>S. mansoni</i>	60
5.2.Mapeamento de eosinófilos em granulomas intestinais	62
5.2.1.Eosinófilos colonizam robustamente granulomas PE tanto no ID como no IG	62
5.2.2.Eosinófilos concentram-se nas zonas medial e periférica dos granulomas	64
5.2.3.MBP-1 predomina na zona periférica de granuloma intestinais	66
5.2.4.Eosinófilos CD34+ concentram-se nas zonas periféricas de granulomas	68
5.2.5.Expansão e modulação fenotípica das subpopulações de eosinófilos ao longo do	69
intestino durante a infecção por <i>S. mansoni</i>	69
6.DISSCUSSÃO.....	72
7.CONCLUSÕES.....	79
7.1.Mapeamento de granulomas no intestino.....	79
7.2.Mapeamento de eosinófilos em granulomas intestinais	79
8.REFERÊNCIAS.....	81

1.INTRODUÇÃO

1.1. Esquistossomose

1.1.1. Aspectos gerais e epidemiológicos

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma*, muito associada à falta de acesso à água potável e a condições inadequadas de saneamento básico. Com ocorrência em 78 países, sendo 51 de transmissão endêmica (Figura 1), estima-se que mais de 200 milhões de pessoas são afetadas pela doença e mais de 200 mil mortes ocorram anualmente (WHO 2023, Pecha, Martinez et al. 2024).

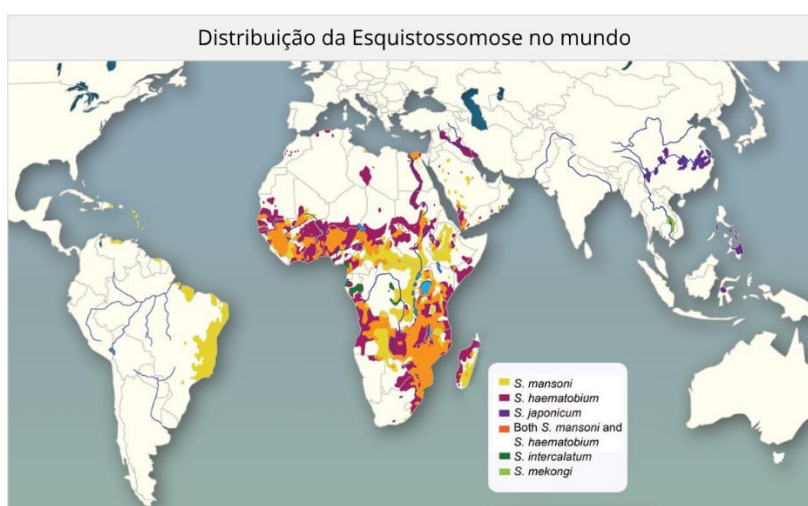


Figura 1: Distribuição da Esquistossomose no mundo. Fonte: Adaptado de WEERAKOON et al., 2015.

Dentre as espécies do gênero, sete são responsáveis por causar a doença em humanos — *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. guineensis* (Weerakoon, Gobert et al. 2015) –, sendo apenas *S. mansoni* com ocorrência no Brasil (Amaral, Silva et al. 2017, WHO 2023). A chegada da esquistossomose no país é datada da época da escravidão, com o tráfico de pessoas infectadas advindas da África, onde o parasito encontrou um ambiente promissor para seu desenvolvimento, com a presença de um hospedeiro intermediário suscetível (moluscos do gênero *Biomphalaria*) (SVSA 2024).

No Brasil, estima-se que mais de 1,5 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para a doença, apresentando mais de 428 mil casos e mais de 7 mil mortes registradas entre o período de 2010 – 2023 (SINAN 2023). Dentre os casos registrados, a esquistossomose intestinal é a forma clínica mais prevalente desse período. Os estados considerados endêmicos no Brasil são: Maranhão, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo. Em outros estados como o Pará, Piauí, Ceará, Goiás, Distrito Federal, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e o Rio Grande do Sul, a transmissão é considerada focal, não atingindo grandes áreas (Figura 2) (SINAN 2023, SISPCE 2023).

ESQUISTOSSOMOSE NO BRASIL - Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)

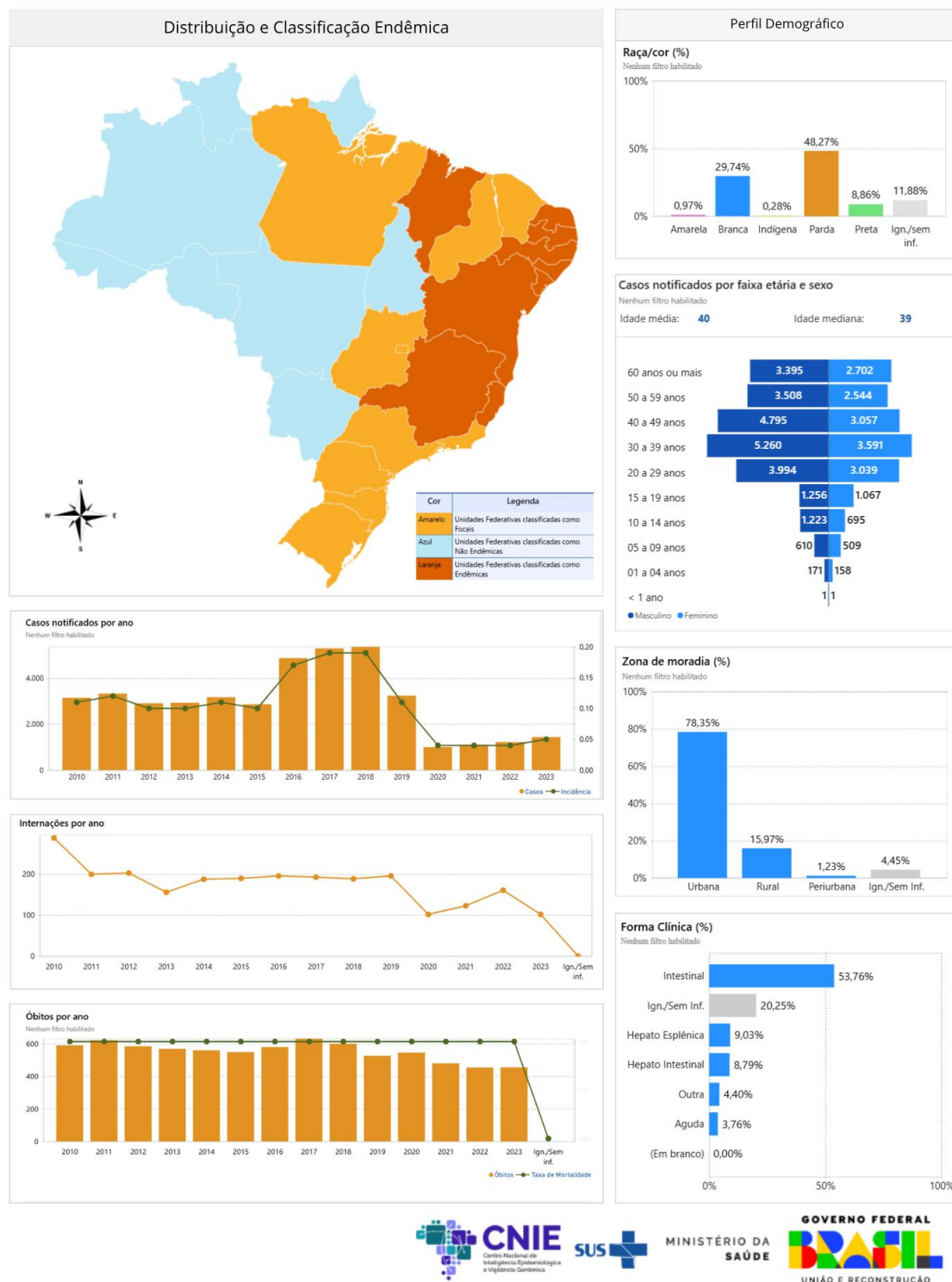


Figura 2: Distribuição, classificação endêmica e perfil demográfico para esquistossomose mansoni no Brasil, no período de 2010 à 2023. Fonte: Adaptado de SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação em parceria com o Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/cnie/painel-esquistossomose>

Durante o ano de 2023, novos índices de incidência da esquistossomose evidenciaram a ocorrência da doença em regiões não consideradas endêmicas, como os estados de Rondônia e Mato Grosso, indicando uma nova configuração na distribuição da doença, em comparação ao padrão endêmico do país (Figura 3) (SINAN 2023, SISPCE 2023).

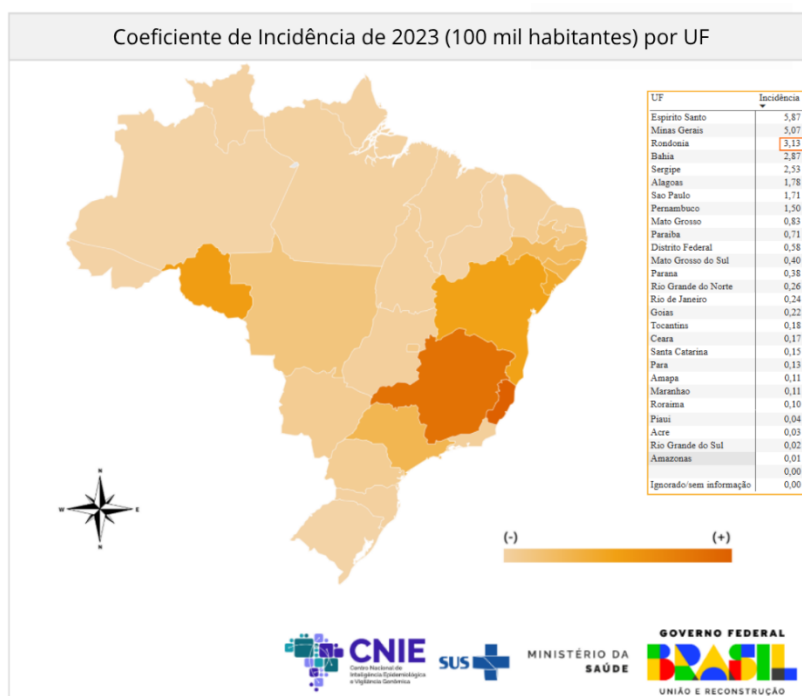


Figura 3: Incidência da esquistossomose mansônica no Brasil em 2023. Fonte: Adaptado de SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação em parceria com o Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/cnie/painel-esquistossomose>

1.1.2. Ciclo de vida do parasito *S. mansoni*

O ciclo de vida do *S. mansoni* é composto por duas fases: assexuada e sexuada. A fase assexuada, ocorre no hospedeiro intermediário, representada por moluscos do gênero *Biomphalaria*. Com 18 espécies como hospedeiro de *S. mansoni*, no Brasil apenas *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* fazem parte do ciclo da doença, com prevalência de *B. glabrata* devido à sua distribuição geográfica e alta susceptibilidade à infecção (McManus, Bergquist et al. 2020, SVSA 2024). A fase sexuada, ocorre no hospedeiro definitivo, representada por animais vertebrados mamíferos, com prevalência em humanos, mas podendo infectar outros mamíferos como roedores, cães, primatas e eventualmente bovinos (Figura 4) (Colley, Bustinduy et al. 2014).

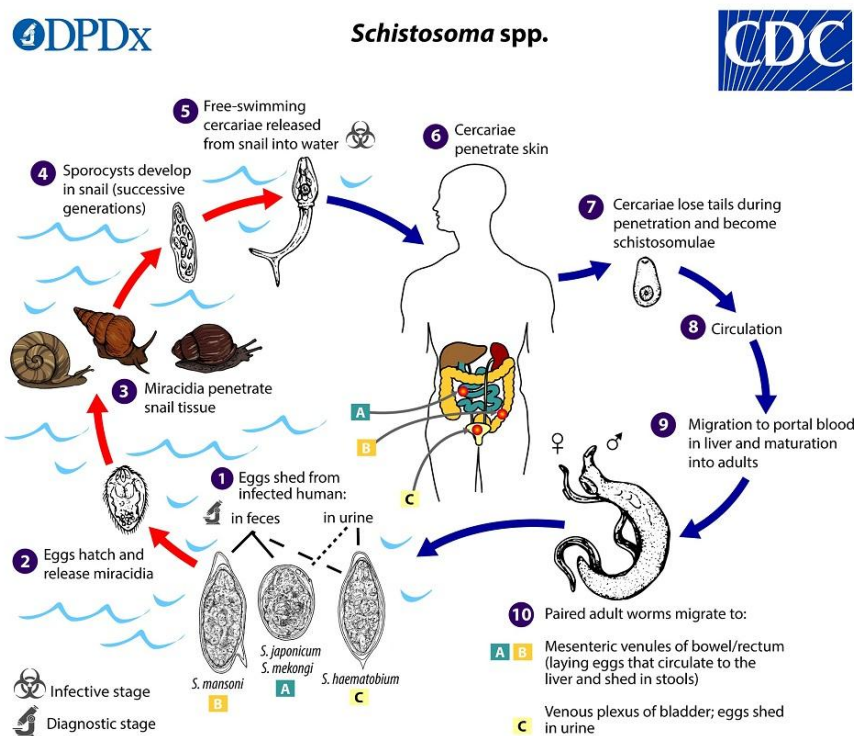


Figura 4: Ciclo biológico do *S. mansoni*. Fonte: Adaptado de CDC - Centers of Disease Control and Prevention, Disponível em: www.cdc.gov/parasites/

A fase assexuada inicia-se com a liberação dos ovos em um ambiente aquático de pouca movimentação. Nesse ambiente, em condições ótimas de temperatura, oxigenação e luminosidade, ocorre a eclosão dos miracídios, larvas ciliadas natantes, que são a forma infectante do hospedeiro intermediário. Após a penetração do parasito no molusco, os miracídios perdem a placa ciliada e se transformam em esporocisto primário. O processo denominado poliembrião, inicia-se com a replicação das células germinais que dão origem ao esporocisto secundário. Essa forma do parasito pode ir para os tecidos, replicar-se ou entrar em embriogênese, que consiste na produção de cercárias - forma infectante do hospedeiro definitivo (Buonfrate, Ferrari et al. 2025, Torsello, Cattani et al. 2026). A partir de um esporocisto secundário produz-se milhares de cercárias. A nova forma infectante, de cauda bifurcada, é liberada no ambiente aquático dando continuidade ao ciclo (Figura 4) (Gryseels, Polman et al. 2006).

A fase sexuada inicia-se com a penetração ativa de cercárias presentes no ambiente aquático, na pele ou mucosa do hospedeiro definitivo. Após a infecção, as cercárias perdem a cauda bifurcada e se transformam em esquistossômulos. Essa forma do parasito migra subcutaneamente para o coração e pulmão, onde caem na circulação sistêmica e percorrem em

direção a outros órgãos até atingir o sistema porta-hepático. Entre 20 e 30 dias, os parasitos amadurecem e formam vermes adultos, machos e fêmeas, com dimorfismo sexual. Após a maturação sexual, vermes acasalados migram para as veias mesentéricas inferiores, onde se nutrem do sangue e fazem oviposição. Cerca de 100 a 300 ovos são liberados por dia (Mooe and Sandgeound 1956). Esses ovos podem ser embolizados e retidos em órgãos-alvo, como fígado e baço, desencadeando uma resposta inflamatória granulomatosa. No entanto, grande parte dos ovos é capaz de migrar através da parede vascular para a submucosa intestinal, onde atravessam a parede do intestino em direção ao lúmen, podendo também causar uma resposta inflamatória granulomatosa, que auxilia na expulsão do parasito (Schwartz and Fallon 2018, Malta, Palazzi et al. 2022). Uma vez liberados nas fezes, após atravessarem a parede intestinal, esses ovos darão continuidade ao ciclo do parasito (Schwartz and Fallon 2018).

1.1.3. Resposta imune no hospedeiro vertebrado

1.1.3.1. Imunopatogênese

No hospedeiro vertebrado, a infecção por *S. mansoni* induz uma resposta imunológica complexa que evolui ao longo do tempo e está associada tanto ao combate ao parasito quanto à patologia da doença (Malta, Palazzi et al. 2022).

O início da infecção, caracterizado pela presença de esquistossômulos e larvas jovens, induz a resposta imune inata. Nesta primeira linha de defesa, ocorre o reconhecimento dos antígenos, a partir de receptores de reconhecimento padrão (PRR – *pattern recognition receptors*) e do tipo *Toll-like* (TLR -2, -3, -4, -9), que estão associados à produção de citocinas e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento e migração de células durante a resposta imune adaptativa. Este início da infecção é mediado por linfócitos do tipo *T-helper* (Th) (Figura 5) (Zheng, Zhang et al. 2020).

Inicialmente, a resposta é caracterizada pelo perfil de *T-helper* do tipo 1 (Th1), com expressão de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e as interleucinas (IL) -1, -2 e -12, indicando a fase aguda da doença (Malta, Palazzi et al. 2022). A reação mediada por Th1 pode causar sintomas como febre, tosse seca e angioedema, seguidos do aumento da taxa de eosinófilos na corrente sanguínea (Barsoum, Esmat et al. 2013).

Com o início da oviposição a partir da sexta semana, antígenos solúveis excretados pelos ovos (SEA – *soluble egg antigens*) induzem a mudança gradual de perfil de resposta para T-helper do tipo 2 (Th2). Essa nova resposta é caracterizada pela expressão de IL-4, -5 e -13, além da produção ativa de imunoglobulina E (IgE). O aumento da resposta inflamatória é marcado por eosinofilia e a formação de granulomas (Burke, Jones et al. 2009, Fairfax, Nascimento et al. 2012).

Com a progressão da doença, a resposta Th2 é modulada negativamente, ao passo que ocorre um pequeno aumento da resposta Th1, alcançando um perfil inflamatório mais equilibrado. A ação de células T reguladoras (Tregs) e B reguladoras (Bregs) são responsáveis pela diminuição da resposta Th2, através da via mediada por IL-10, imunorregulando Th1/Th2 (Figura 5). Esse momento marca a transição da fase aguda para a fase crônica da doença (Wynn, Thompson et al. 2004, Lundy and Lukacs 2013).

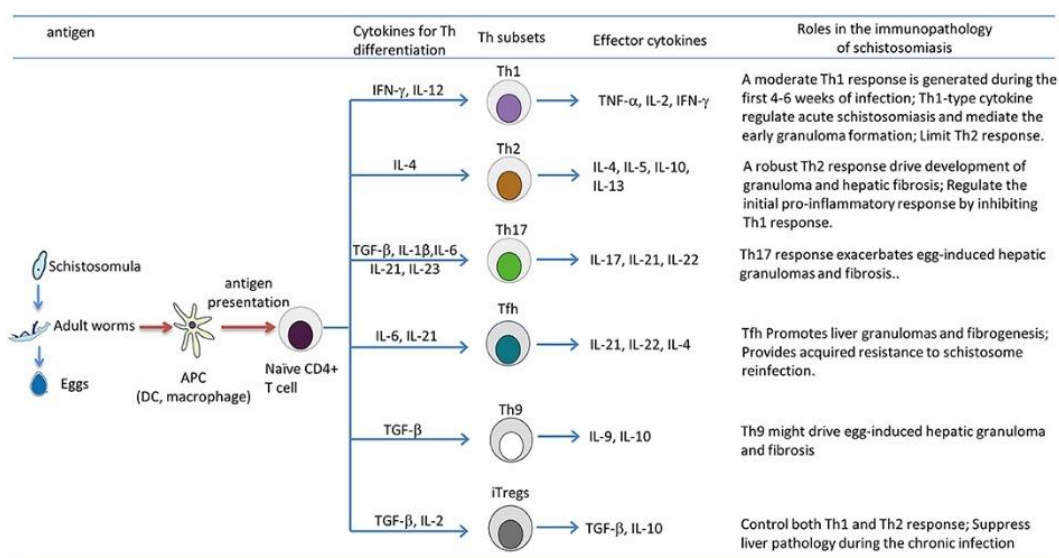


Figura 5: Imunopatologia das subpopulações de células T durante a esquistossomose murina. Fonte: ZHENG et al., 2020.

1.1.3.2. Resposta inflamatória granulomatosa

A principal característica patológica da esquistossomose mansônica é a resposta inflamatória granulomatosa. Os granulomas (Figura 6) são estruturas dinâmicas, organizadas e que apresentam modificações ao longo tempo (Malta, Silva et al. 2021). São formados a partir do recrutamento de células inflamatórias e residentes (eosinófilos, linfócitos T, macrófagos e

plasmócitos), que se distribuem ao redor do ovo do parasito e formam uma matriz extracelular (MEC) heterogênea (Lenzi, Kimmel et al. 1998).

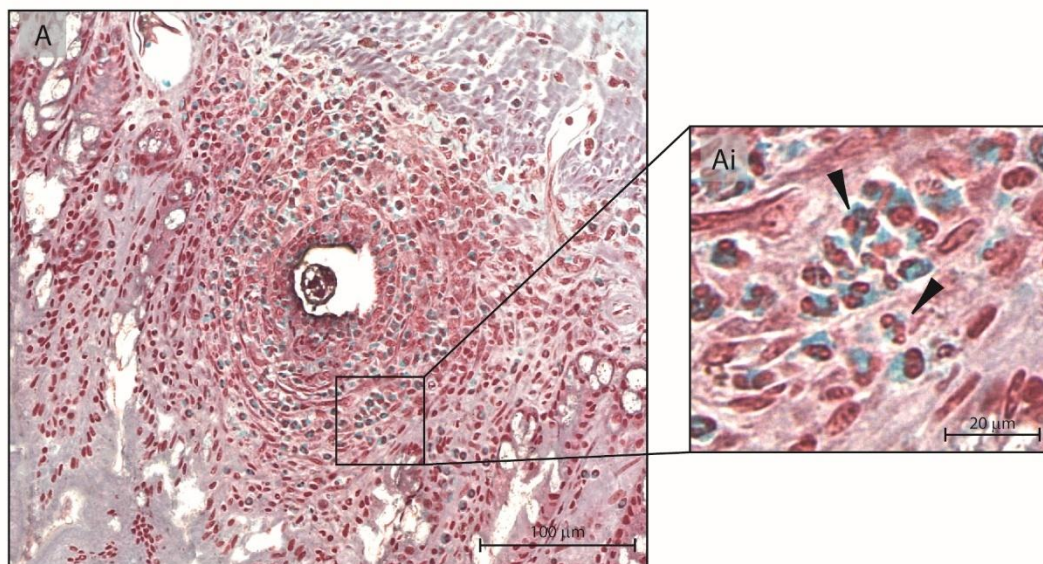


Figura 6: Imagem representativa de (A) um granuloma intestinal de camundongo infectado por *S. mansoni* e corado por *Fast Green & Neutral Red*. (Ai) Eosinófilos com citoplasma corado em verde (seta).

A dinamicidade granulomatosa relaciona-se às diferentes conformações que esse ecossistema apresenta ao longo do tempo (Figura 7). Na literatura, são observadas várias classificações de granulomas em estágios, divididos em duas fases: i) uma fase imatura – fase pré-granulomatosa – caracterizada pelo intenso recrutamento de células inflamatórias vindas da corrente sanguínea, que se dispõem ao redor do ovo do parasito; ii) uma fase madura – fase granulomatosa com granulomas bem estabelecidos e estruturalmente compactos, com distribuição das células em camadas e deposição de matriz rica em fibras de colágeno. A fase granulomatosa é um sistema evolutivo que culmina com um estágio involutivo, no qual o número de células diminui, dando espaço para uma camada mais espessa de matriz extracelular (Amaral, Silva et al. 2017, Malta, Palazzi et al. 2022).

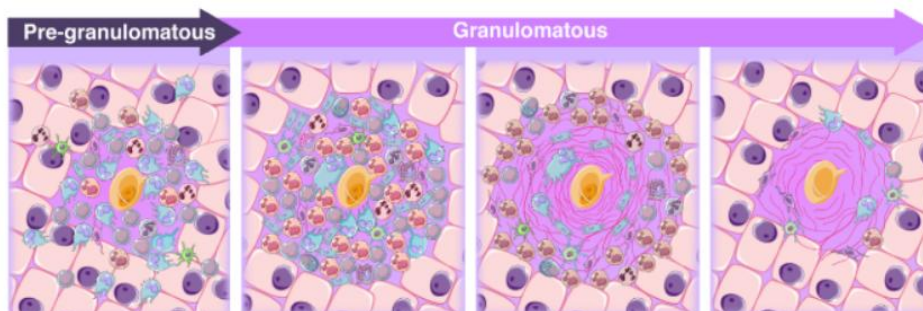


Figura 7: Representação da microarquitetura granulomatosa e suas variações ao longo do tempo. Fonte: Adaptado de MALTA et al., 2021.

A formação dos granulomas ocorre em órgãos alvo da doença, principalmente no fígado e intestino. No fígado, essa resposta está associada à proteção do tecido hepático contra as toxinas secretadas pelos ovos (Chuah, Jones et al. 2014). No intestino, os granulomas além de promoverem proteção tecidual, associam-se à translocação dos ovos através da parede intestinal em direção ao lúmen, garantindo a continuidade do ciclo do parasito (Schwartz and Fallon 2018). Devido às diferenças funcionais, granulomas hepáticos e intestinais também podem apresentar variações em sua morfologia, como: volume, forma, deposição de fibras de colágeno em suas matrizes e também em sua composição celular (Moore, Grove et al. 1977, Grimaud, Boros et al. 1987, Lenzi, Kimmel et al. 1998, Barata, Malta et al. 2025). Contudo, a resposta granulomatosa também pode contribuir para o agravamento da doença, devido à persistência da inflamação e acúmulo de fibras de colágeno, causando fibrose tecidual. Assim, granulomas podem ser considerados elemento-chave no curso e na gravidade da doença (Llanwarne and Helmby 2021).

1.2. Eosinófilos

1.2.1. Aspectos gerais

Os eosinófilos constituem menos de 5% dos leucócitos circulantes de indivíduos adultos saudáveis, mas são encontrados em maior quantidade nos tecidos, com destaque para o tecido intestinal (Ackerman and Stacy 2024). O número destas células aumenta acentuadamente no sangue e/ou no tecido durante inúmeros processos inflamatórios incluindo doenças infecciosas causadas por parasitos (doenças helmínticas), fungos, vírus e certas bactérias; doenças alérgicas

e auto-imunes; desordens sem causa reconhecível como por exemplo a síndrome hipereosinofílica; desordens da pele e do trato gastrointestinal e até mesmo certos tipos de câncer (Weller and Spencer 2017, Melo, Dvorak et al. 2022).

Essas células são caracterizadas por sua morfologia única com núcleo bi ou polilobulado e uma rica população de grânulos secretores no citoplasma, denominados grânulos específicos, com cristalóide central elétron-denso circundado por uma matriz elétron-lúcida (Figura 8) (Melo, Dvorak et al. 2022).

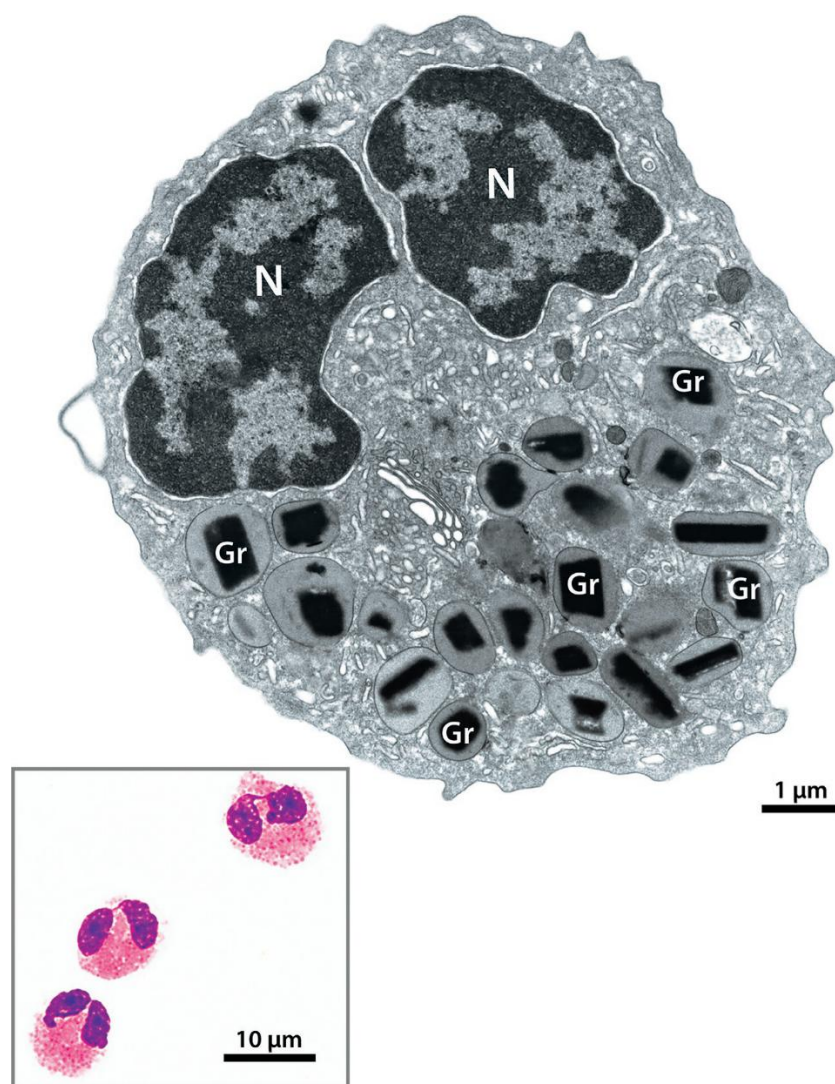
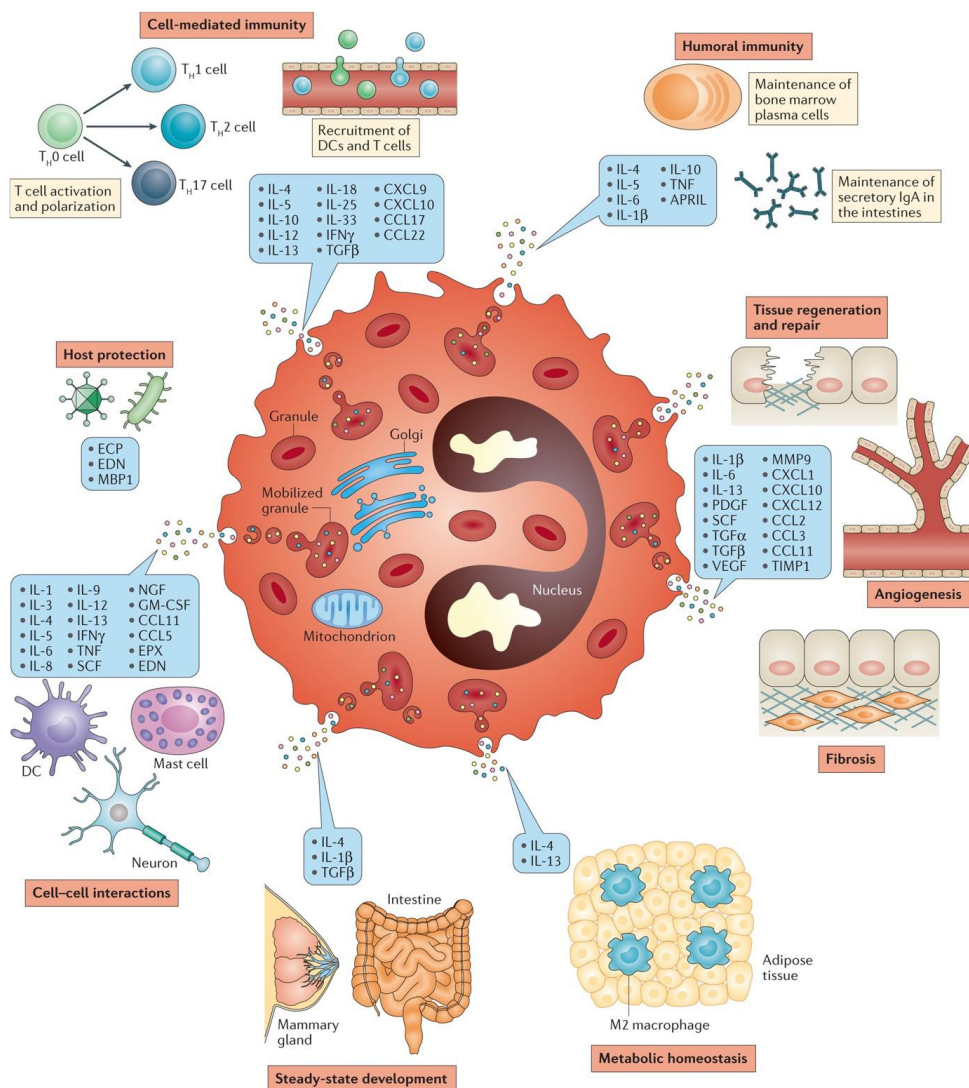


Figura 8: Características ultraestruturais de um eosinófilo humano maduro. (N) Núcleo. (Gr) Grânulos. Fonte: Adaptado de MELO et al., 2022.

Nos grânulos dos eosinófilos são armazenadas altas quantidades de proteínas catiônicas, como proteína básica principal (MBP do inglês *major basic protein*), peroxidase eosinofílica

(EPO - *eosinophil peroxidase*), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN - *eosinophil-derived neurotoxina* – também conhecida como RNase 2), e proteína catiônica principal (ECP - *eosinophil cationic protein* – também conhecida como RNase 3) – ambas com potente atividade ribonucleásica (RNase), que conferem a acidofilia citoplasmática típica dessas células, quando coradas através de técnicas citológicas, principalmente Hematoxilina-Eosina (HE) (Weller and Spencer 2017). Além disso, os eosinófilos secretam diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, como interleucina (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, RANTES (CCL5) e eotaxina (CCL11), conferindo a essas células um vasto potencial para atuar no contexto de saúde e de doenças (Figura 9) (Weller and Spencer 2017).

Os eosinófilos apresentam papéis importantes na homeostase do organismo, sendo residentes de vários tecidos mucosos, como útero, glândula mamária, pulmão e intestino (Weller and Spencer 2017). Estudos recentes têm demonstrado a natureza altamente plástica dessas células e sua implicação em vários processos homeostáticos (Weller and Spencer 2017, Arnold and Munitz 2024). Os eosinófilos são hoje considerados células multifuncionais e com interações multifacetadas, cujas atividades parecem depender do local e das condições onde estas células se encontram, podendo atuar como células importantes do metabolismo, do desenvolvimento ou da imunidade e/ou como células efetoras ou imunorreguladoras (Arnold and Munitz 2024).



Nature Reviews | Immunology

Figura 9: Eosinófilos: mediadores e funções. Fonte: WELLER; SPENCER, 2017.

1.2.2. Maturação e ativação

Eosinófilos são derivados de células tronco hematopoiéticas multipotentes, presentes na medula óssea, que se diferenciam em linhagens celulares de granulócitos, neutrófilos, basófilos e os eosinófilos. Devido a fatores de transcrição dos progenitores pluripotentes, precursores eosinofílicos são comprometidos com a diferenciação, com principal mediação da citocina IL-5, e consequente eventos de maturação e proliferação de eosinófilos.

Através do microscópio eletrônico de transmissão (MET), é possível identificar características ultraestruturais durante os eventos de maturação, ativação e secreção de

eosinófilos (Melo, Dvorak et al. 2010, Melo, Dvorak et al. 2022). Quando imaturos, essas células apresentam núcleo mais arredondado e predominantemente eucromático, grânulos em processo de condensação e cristalização, denominados grânulos específicos imaturos, maior volume celular, e maior número de organelas, como complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Melo, Dvorak et al. 2022). Durante a maturação e diferenciação, o número de grânulos exibindo um cristalóide aumenta e o núcleo se torna segmentado e com cromatina marginal condensada (heterocromatina) em paralelo à redução no volume celular e na quantidade de organelas citoplasmáticas (Melo, Dvorak et al. 2022).

Na ativação, os grânulos são estruturalmente alterados, com desintegração do cristalóide e perda gradual de seus conteúdos; há aumento de formação de vesículas, formação e acúmulo de corpúsculos lipídicos, e remodelagem mitocondrial (Figura 10) (Melo and Weller 2018, Melo and Silva 2024).

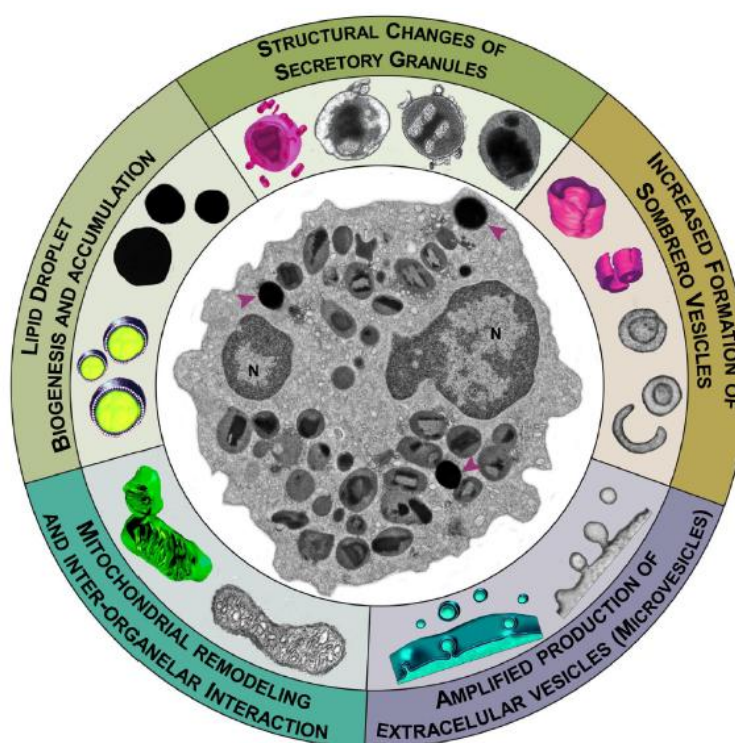


Figura 10: Ultraestrutura de eosinófilos durante a ativação. Fonte: MELO, 2024.

1.2.3. Processos de secreção

Coletivamente, a secreção de produtos derivados de grânulos de eosinófilos para o meio extracelular recebe o nome de desgranulação e ocorre através de três processos principais:

exocitose – clássica e composta, desgranulação por *piecemeal* (PMD) e citólise (Figura 11) (Spencer, Bonjour et al. 2014, Melo, Dvorak et al. 2022). A exocitose em eosinófilos é um processo raramente observado *in vivo* enquanto a PMD e a citólise constituem processos frequentemente observados em diversas doenças (Melo, Spencer et al. 2008). Através da secreção, eosinófilos são capazes de liberar diversos mediadores inflamatórios estocados em seus grânulos, tais moléculas são fundamentais para mediação da inflamação, como na modulação da resposta imune, interação com outras células, homeostase metabólica, imuno polarização e reparo tecidual (Melo, Liu et al. 2013).



Figura 11: Mecanismos de secreção de eosinófilos. Fonte: Adaptado de SPENCER et al. 2014.

1.2.3.1. Exocitose

No processo de exocitose (Figura 11), ocorre a fusão de grânulos com a membrana plasmática, podendo ocorrer através da exocitose clássica ou composta. Na exocitose clássica, grânulos individualizados fundem-se diretamente com a membrana plasmática enquanto na exocitose composta, ocorre a fusão de múltiplos grânulos específicos, formando câmaras no citoplasma, que posteriormente se fundem com a membrana plasmática, permitindo a liberação do conteúdo (Melo and Weller 2018).

A exocitose em eosinófilos constitui um mecanismo altamente regulado e envolve uma série de eventos coordenados, incluindo a mobilização ou translocação dos grânulos para a periferia celular, o acoplamento entre os grânulos e a membrana plasmática, seguido da fusão das membranas e da liberação dos mediadores (Melo and Weller 2018).

1.2.3.2. PMD

É o processo de desgranulação caracterizado pelo esvaziamento gradual do conteúdo dos grânulos específicos, enquanto a membrana limitante destes permanece intacta (Figura 11). Esse processo foi descrito pela primeira vez em 1974, em basófilos humanos durante a resposta alérgica na pele, e posteriormente identificado em eosinófilos humanos intestinais durante a doença de Crohn (Melo, Dvorak et al. 2010).

À microscopia eletrônica de transmissão (MET), o processo é identificado pela presença de áreas elétricas lúcidas em grânulos específicos. Os grânulos mobilizados para esvaziamento de seu conteúdo apresentam desarranjo de matriz, redução da elétrica densidade e presença de cristaloídes residuais. O processo de desgranulação por PMD é mediado por vesículas de transporte, que transferem parte do conteúdo dos grânulos para a superfície celular (Melo, Dvorak et al. 2010). Trata-se de um processo seletivo onde moléculas específicas, por exemplo tipos específicos de citocinas, são selecionados dependendo do estímulo recebido pela célula (Melo and Weller 2018). O mecanismo envolve a participação de receptores intracelulares específicos, presentes tanto na membrana limitante dos grânulos, como em vesículas transportadoras (Spencer, Bonjour et al. 2014), tais como CCR3 e IL-6R α , presentes no interior de eosinófilos humanos quando estimulados por eotaxina (Melo, Spencer et al. 2008).

Em eosinófilos humanos, esse mecanismo tem a participação de um sistema túbulo-vesicular com morfologia única. Com aspecto de “chapéu mexicano” quando observadas ao MET, essas vesículas denominadas vesículas sombrero, ou EoSVs (*Eosinophil Sombrero Vesicles*) brotam dos grânulos e podem acomodar moléculas tanto em seu lúmen, como é o caso da MPB-1, ou em associação com sua membrana envoltória, por exemplo IL-4 e IFN- γ (Carmo, Bonjour et al. 2018, Melo and Weller 2018). Esse mecanismo já foi descrito como o principal processo de secreção utilizado por eosinófilos no contexto granulomatoso, durante a infecção experimental por *S. mansoni* em modelo murino (Dias, Amaral et al. 2018).

1.2.3.3. Citólise

É um processo tipicamente associado à morte celular para diversos tipos celulares; para eosinófilos, no entanto, constitui também um importante processo para liberação do conteúdo de seus grânulos para o meio extracelular (Figura 11).

Também conhecido como desgranulação lítica, a principal característica desse processo é a liberação de grânulos intactos os quais permanecem funcionais na matriz extracelular, após a morte da célula. Esse mecanismo é caracterizado pela perda inicial da integridade da membrana plasmática, seguido pela ruptura completa desta, associada à descondensação e dissolução da cromatina, além da degeneração de outras organelas. Tal mecanismo foi o principal mecanismo utilizado por eosinófilos estudados em biópsias retais humanas de pacientes infectados por *S. mansoni* (Melo, Dvorak et al. 2022).

A ETose é um importante tipo de citólise, inicialmente descrito em neutrófilos e posteriormente identificado em eosinófilos. Na ETose de eosinófilos, ocorre a liberação de armadilhas extracelulares de DNA nuclear, denominadas EETs (*Eosinophil Extracellular Traps*). Nessas estruturas em redes, imersas na matriz extracelular dos tecidos, permanecem retidos os grânulos intactos e funcionais provenientes da citólise, além de vesículas sombrero (Melo, Dvorak et al. 2022).

1.2.4. Eosinófilos no contexto da esquistossomose

Na esquistossomose mansônica, a eosinofilia é uma característica marcante, observada na medula óssea, no sangue periférico e nos tecidos do hospedeiro, especialmente ao redor do esquistossômulo invasor e dos ovos do parasito (Malta, Palazzi et al. 2022).

O granuloma esquistossomótico constitui um ecossistema dinâmico, com mudanças estruturais e funcionais progressivas, abrigando diversas populações celulares. Durante a fase aguda da infecção, a eosinofilia ocorre em dois picos, sendo que, no período de maior atividade inflamatória, os eosinófilos podem representar mais de 50% das células presentes nos granulomas (Amaral, Silva et al. 2017). Na fase crônica, sua frequência tende a diminuir (Barata, Malta et al. 2025).

Apesar de sua abundância, o papel dos eosinófilos na esquistossomose mansônica permanece pouco esclarecido. Tradicionalmente associados a uma função helmintotóxica e protetora, estudos *in vitro* demonstram sua ação efetora contra diferentes estágios do ciclo de vida do *S. mansoni*, incluindo esquistossômulos, vermes adultos e ovos, destacando-se a proteína básica principal como uma das principais moléculas envolvidas, capaz de eliminar larvas no interior dos ovos (Butterworth, Wassom et al. 1979, Capron, Torpier et al. 1979, Capron and Capron 1992). Contudo, evidências *in vivo* não sustentam plenamente esse papel

citotóxico, indicando uma função mais imunorreguladora na imunidade inata e adaptativa (de Oliveira, Rodrigues et al. 2022). Achados recentes do grupo mostram que os eosinófilos colonizam robustamente granulomas hepáticos apresentando um nicho ecológico principal na zona periférica, o que aponta para um papel predominantemente modulador dessas células nesse contexto, mudando o paradigma de uma visão clássica dos eosinófilos como “destruidores de helmintos” (Barata, Malta et al. 2025).

1.3. Intestino

1.3.1. Aspectos gerais

O intestino é uma extensa porção do trato gastrointestinal responsável principalmente pela digestão, absorção de nutrientes, absorção de água e eliminação de resíduos fecais. Dividido em Intestino Delgado (ID) e Intestino Grosso (IG), apresenta movimentos peristálticos e segmentares, que promovem a mistura do conteúdo intestinal e seu deslocamento ao longo do órgão. Esses movimentos são regulados pelo sistema nervoso entérico, que atua de forma independente do sistema nervoso central (Henderson 1928).

O intestino delgado inicia-se imediatamente após o estômago e constitui a maior extensão do intestino. Nele ocorrem as etapas finais da digestão dos alimentos, bem como a maior parte da absorção de nutrientes. Em sequência, o intestino grosso é responsável principalmente pela absorção de água e eletrólitos, contribuindo para a formação e posterior eliminação do bolo fecal.

O intestino abriga uma microbiota intestinal composta por trilhões de microorganismos, que é fundamental para a digestão de componentes não absorvíveis, síntese de vitaminas, modulação do sistema imunológico e manutenção da homeostase intestinal (Álvarez, Real et al. 2021, Ignacio, Shah et al. 2022). Além disso, o órgão apresenta tecido linfóide associado a mucosa (GALT), que desempenha importante papel na defesa imunológica, contribuindo na imunidade intestinal (Mörbe, Jørgensen et al. 2021, Bertoldi, da Silva et al. 2024).

A imunidade intestinal integra mecanismos de barreira física e respostas imunes inata e adaptativa, atuando de forma coordenada para a manutenção da homeostase do trato gastrointestinal. Por meio do GALT, da atividade das células epiteliais e da ação de populações

celulares como células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, neutrófilos e linfócitos T e B, o intestino promove tolerância à microbiota e aos antígenos alimentares, ao mesmo tempo em que mantém respostas eficazes contra patógenos. A desregulação desses mecanismos compromete a integridade da mucosa e favorece o desenvolvimento de processos inflamatórios intestinais (Bertoldi, da Silva et al. 2024).

1.3.2. Características morfológicas

À luz da anatomia (Figura 12), o intestino é um órgão tubular oco constituído por quatro túnicas/camadas em sua parede: mucosa, submucosa, muscular e serosa.

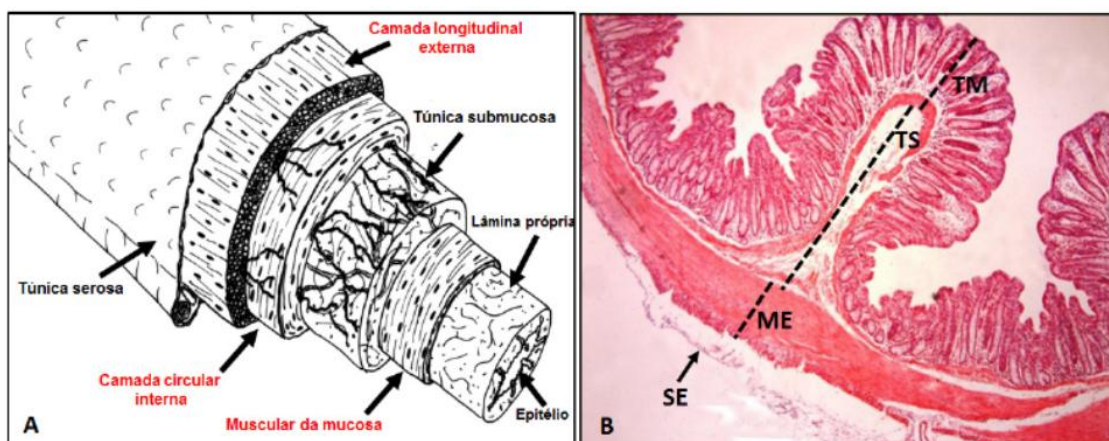


Figura 12: Organização histológica geral do tubo digestório. (A). Desenho esquemático identificando as túnicas do intestino. (B). Identificação das túnicas do intestino em corte histológico de intestino grosso. TM: mucosa; TS: submucosa; ME: muscular externa; SE: serosa. Aumento 40X, coloração HE. Fonte: Sistema digestório: integração básico-clínica. Capítulo 12 – Histologia do tubo digestório. (pp.273-314) Nasciutti et al. 2016. DOI:10.5151/9788580391893-12

A túnica mucosa apresenta um epitélio de revestimento simples cilíndrico, constituído principalmente de enterócitos e células caliciformes interpostas. Essas células apresentam microvilosidades, evaginações da membrana plasmática responsáveis pelo aumento da superfície de contato, favorecendo a absorção de água e nutrientes. A lâmina epitelial é seguida da lâmina própria, camada de tecido conjuntivo frouxo, altamente vascularizada, que abriga vasos e nódulos linfáticos. A mucosa é delimitada pela lâmina muscular da mucosa, constituída por duas camadas de músculo liso que envolvem a lâmina própria (Nasciutti, Narciso et al. 2016).

A túnica submucosa é constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, no qual se encontram vasos sanguíneos e o plexo submucoso, composto por gânglios e nervos. Nessa

camada, não há presença de glândulas, com exceção da primeira porção do intestino delgado. A túnica muscular é formada por duas camadas de músculo liso: uma camada interna circular e uma camada externa longitudinal. Entre essas camadas, encontra-se o plexo mientérico, formado por gânglios e nervos, responsável pela coordenação dos movimentos peristálticos do órgão. Externamente, o intestino é revestido pela túnica serosa, formada por tecido conjuntivo revestido por mesotélio, caracterizado por epitélio simples pavimentoso que compõem o peritônio visceral (Nasciutti, Narciso et al. 2016).

Este órgão tubular é dividido em intestino delgado e grosso (Figura 13), cujas principais diferenças referem-se às suas porções anatômicas e às variações na composição de suas túnicas.

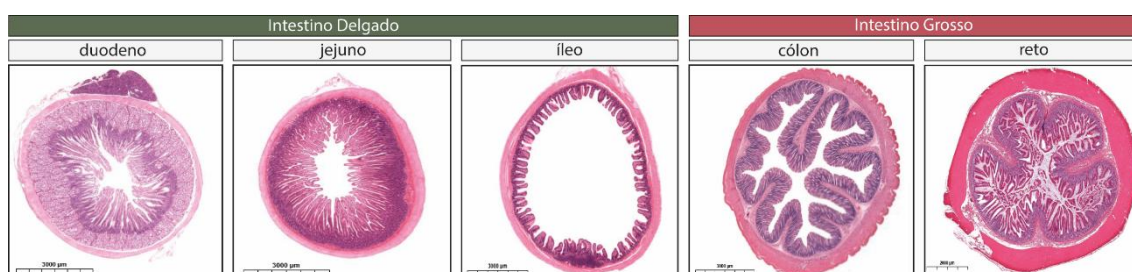


Figura 13: Corte transversal do tubo digestório das porções dos intestinos delgado e grosso: duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto. Coloração HE. Fonte: Adaptado do Histology Guide. Disponível em: <https://histologyguide.com/>.

O intestino delgado é caracterizado pela presença de vilosidades, evaginação da mucosa que promovem aumento da superfície de absorção, e é subdividido em: duodeno, jejuno e íleo (Figura 13). O duodeno, primeira porção, distingue-se pela presença de glândulas duodenais, responsáveis pela secreção de muco alcalino, que auxilia na neutralização do pH do conteúdo proveniente do estômago. O jejuno compõe a maior extensão do intestino delgado e não apresenta diferenças morfológicas marcantes em suas túnicas. O íleo, por sua vez, caracteriza-se pela presença das placas de Peyer, tecido linfoide associado à mucosa gástrica, com importante papel na defesa imunológica (Mörbe, Jørgensen et al. 2021).

O intestino grosso (Figura 13), diferentemente do delgado, não apresenta vilosidades na mucosa. Nessa camada estão presentes as glândulas ou criptas intestinais, com maior número de células caliciformes produtoras de muco, o que facilita o deslocamento dos resíduos fecais. É subdividido em: ceco, cólon, reto e ânus.

1.3.3. Eosinófilos no contexto do intestino

Eosinófilos são encontrados predominantemente no trato gastrointestinal e estão entre os leucócitos residentes intestinais mais abundantes, podendo ocupar cerca de 20-30% dos leucócitos totais encontrados na lâmina própria (Weller and Spencer 2017). Nesse microambiente, desempenham papel central na manutenção da homeostase imunológica e tecidual, contribuindo para a integridade da barreira epitelial, defesa contra microrganismos e remodelamento tecidual (Weller and Spencer 2017).

Os eosinófilos se instalam nos intestinos delgado e grosso ainda no período pré-natal, indicando um papel na vigilância na saúde intestinal e na imunidade inata (Weller and Spencer 2017). Essas células também estão associadas a importantes papéis na regulação da resposta imune adaptativa. No intestino delgado, eosinófilos são numerosos e podem ser encontrados em condições de repouso ao longo das vilosidades. Já no intestino grosso, apresentam-se de forma menos numerosa em condições de repouso, mas podem ter aumento de sua população celular em casos de inflamação, assumindo um papel mais pró-inflamatório.

Em condições homeostáticas, os eosinófilos exercem funções regulatórias importantes, incluindo a produção de IL-1R α , que contribui para a supressão de células Th17 e para o controle da inflamação associada a esse perfil (Weller and Spencer 2017, Xenakis, Howard et al. 2018). Além disso, secretam fatores que favorecem a sobrevivência e manutenção de plasmócitos IgA (Chu, Beller et al. 2014) e estão associados à organização das placas de Peyer. Em condições inflamatórias, os eosinófilos podem sofrer remodelamento fenotípico e expandir sua população por meio do recrutamento de novos eosinófilos da circulação, modificando sua atuação no microambiente intestinal.

Dessa forma, os eosinófilos intestinais evidenciam notável plasticidade funcional, atuando tanto na manutenção da homeostase quanto na amplificação ou modulação de respostas inflamatórias, a depender do contexto imunológico. Apesar do crescente conhecimento acerca dos eosinófilos na imunidade intestinal, pouco se sabe sobre o comportamento, a distribuição e o papel dessas células durante a infecção por *S. mansoni*.

1.3.4. Intestino no contexto da esquistossomose

Durante a infecção helmíntica por *S. mansoni*, o intestino destaca-se como um dos principais órgãos-alvo ao longo do ciclo do parasito no hospedeiro definitivo. Os vermes adultos acasalados instalam-se na vasculatura mesentérica, próxima ao intestino. Nesse ambiente, as fêmeas depositam seus ovos junto aos vasos sanguíneos que irrigam a parede intestinal. Para alcançar o lúmen intestinal e possibilitar sua eliminação nas fezes, os ovos exploram mecanismos da resposta imune do hospedeiro, atravessando o endotélio e a parede intestinal. Essa etapa é essencial para a continuidade do ciclo do parasito na natureza. Para isso, esse processo depende da maturação dos ovos, uma vez que apenas ovos maduros são capazes de ativar o sistema imune (Takaki, Rinaldi et al. 2021), aumentando a probabilidade de sucesso na disseminação da infecção.

Estima-se que os ovos de *S. mansoni* permaneçam viáveis por aproximadamente três semanas, sugerindo que a travessia da parede intestinal ocorra dentro desse período. Em função dessa viabilidade, granulomas intestinais podem apresentar semelhanças com os granulomas hepáticos nos estágios iniciais da infecção (Elbaz and Esmat 2013). No entanto, esses granulomas intestinais podem apresentar diferenças na composição celular quando comparados aos granulomas hepáticos, tais como: aumento da frequência de macrófago e diminuição de eosinófilos e de células T e B (Weinstock and Boros 1983). Contudo, ainda são limitadas as informações quanto à caracterização detalhada da composição celular dos granulomas no intestino.

Para o hospedeiro, a deposição contínua de ovos na parede intestinal pode comprometer a integridade estrutural e funcional do órgão. Entre as possíveis consequências estão hiperplasia tecidual, ruptura da barreira epitelial com maior suscetibilidade a infecções secundárias e oportunistas, obstrução intestinal, alterações na produção de muco pelas células epiteliais e até mesmo associação com o desenvolvimento de câncer colorretal (Cheng, Ling et al. 2020). Nesse contexto, compreender a dinâmica espacial da formação dos granulomas no intestino é fundamental para elucidar os mecanismos que sustentam essas alterações patológicas.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de grandes avanços no entendimento da esquistossomose, a característica patológica mais proeminente desta doença — o granuloma — ainda é um enigma. Os granulomas esquistossomóticos são classicamente definidos como agregados de células imunes, altamente organizados ao redor de ovos do parasito e formados em órgãos-alvo, principalmente fígado e intestinos (Malta, Palazzi et al. 2022). Granulomas são apontados na literatura como exercendo papéis paradoxais, servindo tanto para proteção ao hospedeiro como benefício ao parasito (Hams, Aviello et al. 2013).

Um acúmulo impressionante de eosinófilos ocorre dentro de granulomas esquistossomóticos, com grande debate na área sobre o papel dessas células na doença. Ainda é incerto se os eosinófilos atuam como células efetoras contra o parasito; imunomoduladores da resposta imune; participantes do metabolismo tecidual, o que poderia favorecer a manutenção dos parasitos em seus hospedeiros ou meramente operadores na remodelagem e eliminação de restos celulares após dano tecidual (Chuah, Jones et al. 2014, Malta, Palazzi et al. 2022). Nosso grupo vem estudando o papel dos eosinófilos em granulomas hepáticos e intestinais de forma a contribuir para o melhor entendimento dessas células no microambiente granulomatoso (Amaral, Silva et al. 2017, Dias, Amaral et al. 2018, Malta, Silva et al. 2021).

Recentemente, propusemos o granuloma esquistossomótico como um verdadeiro ecossistema habitado por várias populações de células com diferentes papéis funcionais e interações complexas (Malta, Silva et al. 2021). Nossos estudos têm mostrado que os eosinófilos colonizam robustamente granulomas hepáticos e apresentam um nicho ecológico principal na zona periférica (Barata, Malta et al. 2025). Achados recentes apontam para um papel predominantemente imunomodulador dessas células nesse contexto, mudando o paradigma de uma visão clássica dos eosinófilos como “destruidores de helmintos” (Barata, Malta et al. 2025).

Curiosamente, granulomas hepáticos e intestinais parecem ser funcionalmente distintos. Enquanto granulomas hepáticos são fortemente associados ao aprisionamento do ovo no órgão, os granulomas intestinais são associados à translocação desses ovos através da parede intestinal (Elbaz and Esmat 2013, Schwartz and Fallon 2018). Entretanto, o papel dos granulomas na infecção por *S. mansoni* ainda é pouco compreendido. Em continuidade aos estudos do grupo na área, verificamos que ainda não existe um mapeamento detalhado dos diferentes estágios da

inflamação granulomatosa e distribuição espacial de eosinófilos no intestino como um todo. Diante deste cenário, emergem as seguintes questões: i) Como ocorre a distribuição de granulomas e quais são os seus estágios evolutivos ao longo do intestino delgado e grosso? ii) Como ocorre a distribuição espacial de eosinófilos no contexto da inflamação granulomatosa intestinal?

Nossa hipótese é que, assim como observado nos granulomas hepáticos durante a infecção aguda por *S. mansoni* (Barata, Malta et al. 2025), eosinófilos possuem uma distribuição espacial preferencial no microambiente intestinal, apresentando um nicho ecológico específico nesse órgão. No presente trabalho, pretende-se avançar no entendimento das funcionalidades dos granulomas e dos eosinófilos durante a esquistossomose mansoni.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a distribuição espacial de eosinófilos em granulomas intestinais induzidos pela infecção experimental por *Schistosoma mansoni*.

3.2. Objetivos Específicos

1. Estudar a distribuição de granulomas ao longo de toda a extensão do intestino delgado e grosso.
2. Identificar e caracterizar os granulomas intestinais em diferentes estágios evolutivos.
3. Quantificar a população de eosinófilos nos diferentes estágios evolutivos dos granulomas intestinais.
4. Avaliar a distribuição espacial de eosinófilos nos diferentes estágios evolutivos dos granulomas intestinais.
5. Caracterizar o perfil imunológico de eosinófilos nas diferentes regiões espaciais do intestino delgado e grosso.

4. METODOLOGIA

4.1. Modelo de infecção experimental por *S. mansoni*:

Camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster (n=18) com 8 semanas de idade foram divididos em dois grupos: controle e infectado (60 dias de infecção correspondendo à fase aguda).

Tratamento	Histopatologia	Citometria	Total
Controle	n=5	n=4	n=18
Infectado	n=5	n=4	

Tabela 1: Número de camundongos por grupo experimental.

A infecção foi realizada em parceria com o Laboratório de Medicina Experimental e Saúde da Fiocruz-RJ, por um único inóculo de cercárias de *S. mansoni* (100 cercárias/camundongo), fornecido pelo Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Vacinas Anti-Helmínticas (Instituto Oswaldo Cruz/IOC, Fiocruz, RJ), onde a cepa do LE/RJ do *S. mansoni* é mantida rotineiramente. As cercárias foram obtidas de moluscos *Biomphalaria glabrata* infectados em laboratório, e injetadas subcutaneamente enquanto o grupo controle não recebeu nenhum inóculo. A infecção foi confirmada pela presença de ovos nas fezes dos animais na quinta semana de infecção. Os camundongos foram eutanasiados com 60 dias, o que caracteriza a infecção aguda (Francisco, Terra et al. 2022). A eutanásia foi realizada com solução contendo cloridrato de quetamina (150 mg/kg) à 5% com cloridrato de xilazina (10 mg/kg) à 2% em PBS estéril, por via intraperitoneal no quadrante lateral inferior direito do abdome. O volume final inoculado foi de 200 µL/animal. Todos os procedimentos experimentais estão em conformidade com as diretrizes éticas da Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (L023/2023 – CEUA/IOC).

4.2. Histopatologia:

4.2.1. Coleta das amostras biológicas

O intestino dos animais eutanasiados foram coletados, lavados em tampão fosfato (pH 7,4, 0,1 M), e fixados em solução de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) à 4% (em tampão fosfato pH7,4, 0,1 M). Os intestinos foram processados com a técnica de *Swiss Roll* – rolinho suíço, que consiste em enrolar toda extensão da parede aberta do intestino com o objetivo de permitir a análise do órgão em sua totalidade. Para isso, o intestino foi dividido em porções simétricas e o rolinho foi realizado por porção, conforme a seguir (Figura 14): **Intestino delgado**: i) porção proximal (duodeno + início do jejuno), ii) porção medial (jejuno), iii) porção distal (fim do jejuno + íleo) e **Intestino grosso**: iv) porção proximal (ceco + início do cólon) e v) porção distal (cólon + reto). Os fragmentos (rolinhos) foram transferidos para uma solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 até o início do processamento histológico.



Figura 14: Coleta e Processamento dos intestinos pela técnica de *Swiss Roll* – rolinho suíço.

Animais infectados (n=5)		
Fragmentos	n/animal	8 (a-h)
	Total	40
Porções	n/animal	5 (Figura14, III)
	Total	40
Secções	n/fragmento	3 (c/ intervalo de 300 µm)
	n/animal	24
	Total	120
	Área total de tecido analisada	515 x 10 ⁷ µm ²
Granulomas analisados	n total	1040
	Área total de granuloma	4,6 x 10 ⁷ µm ²
Intestino Delgado	Área total analisada	223 x 10 ⁷ µm ²
	n de granulomas	904
	Área de granulomas	3,9 x 10 ⁷ µm ²
Intestino Grosso	Área total analisada	291 x 10 ⁷ µm ²
	n de granulomas	136
	Área de granulomas	0,6 x 10 ⁷ µm ²

Tabela 2: Parâmetros analisados nos intestinos de camundongos infectados por *S. mansoni*.

4.2.2. Processamento para histologia

Após a fixação e lavagem em tampão, os fragmentos (rolinhos) foram desidratados em série crescente de diferentes soluções alcoólicas (70, 80, 90, 100%), seguido da infiltração em resina glicolmetacrilato (GMA, Leica Historessin) conforme trabalhos prévios do grupo (Amaral, Silva et al. 2017, Barata, Malta et al. 2025). No dia seguinte, os fragmentos foram retirados da resina e colocados em formas próprias que contém a solução de inclusão (resina com endurecedor). Por fim, a polimerização foi finalizada em temperatura ambiente. Após a inclusão, as amostras foram seccionadas utilizando navalha de vidro em micrótomo (Leica RM2155). Três secções do órgão por animal (controle e infectado) foram obtidas e as lâminas coradas com *Fast Green & Neutral Red* (Sigma-Aldrich), conforme os protocolos abaixo (Barata, Malta et al. 2025):

Fast Green & Neutral Red (FG&NR):

- Corar 8 minutos com Fast Green (0,4% em água destilada; Sigma-Aldrich);
- Lavar 1 minuto em água corrente;
- Corar 4 minutos e 30 segundos com Neutral Red (0,5% em água destilada; Sigma-Aldrich);
- Lavar 2 minutos em água corrente;
- Montar a lâmina com Entellan® (Merck Milipore Corporation, Alemanha).

As secções por animal foram obtidas de forma semi-seriada, mantendo-se um intervalo de 300 µm entre si, a fim de garantir que não houvesse duplicação da análise de um mesmo granuloma, de acordo com a metodologia previamente estabelecida pelo grupo (Figura 15).

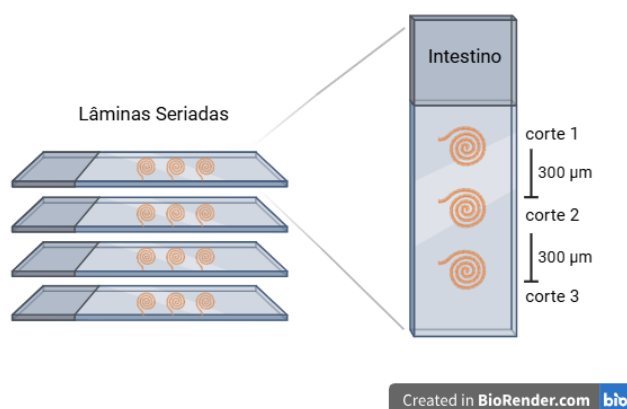


Figura 15: Obtenção de secções histológicas. Três secções histológicas foram obtidas respeitando o intervalo de 300 µm para garantir que granulomas diferentes fossem analisados.

4.2.3. Processamento para imunofluorescência

Os fragmentos do material biológico foram deixados na sacarose (30% em PBS, pH 7,3) *overnight*, incluídos e congelados em solução crioprotetora (O.C.T. Compound Tissue-Tek; Sakura) e seccionados em criostato (7µm; Leica CM1850), com duas secções intervaladas com 300µm, por animal. As lâminas produzidas foram processadas para as seguintes imunomarcações, de acordo com o protocolo abaixo:

Anticorpos primários:

- MBP-1 (James Lee; MT2-14.7.3) à 2µg/mL – para identificação de eosinófilos;
- CD34 (R&D System; AF6518) à 3µg/mL – para identificação de células imaturas de origem hematopoiética;
- IgG1 Isotype Control (R&D System; MAB005) – para controle da reação.

Anticorpos secundários:

- Alexa Fluor 488 Goat anti-rat IgG (Thermo Fisher Scientific) à 4µg/mL (1:500);
- Alexa Fluor 546 Goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific) à 4µg/mL (1:500);
- Alexa Fluor 546 Goat anti-rat IgG (Thermo Fisher Scientific) à 4µg/mL (1:500).

Imunomarcacão de cortes congelados:

- Lavar três vezes os cortes com PBS (pH 8,0) por 5 minutos cada;
- Bloquear os sítios inespecíficos com BSA 3% por 15 minutos;
- Incubar as secções com o anticorpo primário diluído em BSA 1% por duas horas em temperatura ambiente;
- Lavar três vezes os cortes com PBS (pH 8,0) por 5 minutos cada;
- Bloquear os sítios inespecíficos com BSA 3% por 15 minutos;
- Incubar com anticorpo secundário diluído em BSA 1% por duas horas em temperatura ambiente;
- Lavar três vezes os cortes com PBS (pH 8,0) por 5 minutos cada;
- Marcar os núcleos com DAPI (5µg/mL);
- Lavar duas vezes os cortes com PBS (pH 8,0) por 5 minutos cada;
- Lavar uma vez os cortes com água destilada, para remoção de sais residuais do PBS;
- Montar as lâminas com meio de montagem ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific, número de catálogo P36930) para ajudar na preservação da fluorescência.

4.2.4. Whole Slide Imaging (WSI)

WSI é uma técnica de escaneamento de lâminas inteiras que permite a observação precisa e em alta resolução de granulomas em toda a extensão do corte do material (Amaral,

Silva et al. 2017, Melo, Raas et al. 2020). As lâminas provenientes do processamento histológico e da imunofluorescência foram escaneadas utilizando-se o equipamento Panoramic Scan 3D Histech (3D Histech kft., Budapeste, Hungria), no modo convencional ou de fluorescência, respectivamente, acoplado a um computador (Fujitsu Technology Solutions GmbH, Munique, Alemanha). As análises foram realizadas com o software Panoramic Viewer 1.15.2 SP2 RTM (3D Histech kft., Budapeste, Hungria) e Histoquant (3D Histech kft., Budapeste, Hungria).

4.2.5. Análises morfométricas

4.2.5.1. Enumeração e classificação de granulomas

As análises das secções de intestino corados com corantes citológicos foram realizadas por WSI. Inicialmente foi realizada a identificação e classificação dos granulomas de acordo com seu estágio evolutivo conforme estudos anteriores do grupo (Amaral, Silva et al. 2017, Dias, Amaral et al. 2018, Barata, Malta et al. 2025) em: (1) Pré-granulomatoso exsudativo (PE); (2) Necrótico- exsudativo (NE); (3) Exsudativo-produtivo (EP); (4) Produtivo (P). Em seguida, foram avaliados os seguintes parâmetros: i) área total das secções; ii) área ocupada por granulomas; iii) localização dos granulomas nas porções intestinais (Figura 14); iv) localização dos granulomas nas túnicas da parede intestinal (Figura 12); v) classificação dos granulomas; vi) frequência média de cada estágio dos granulomas; vii) zonação espacial dos granulomas (Figura 16).

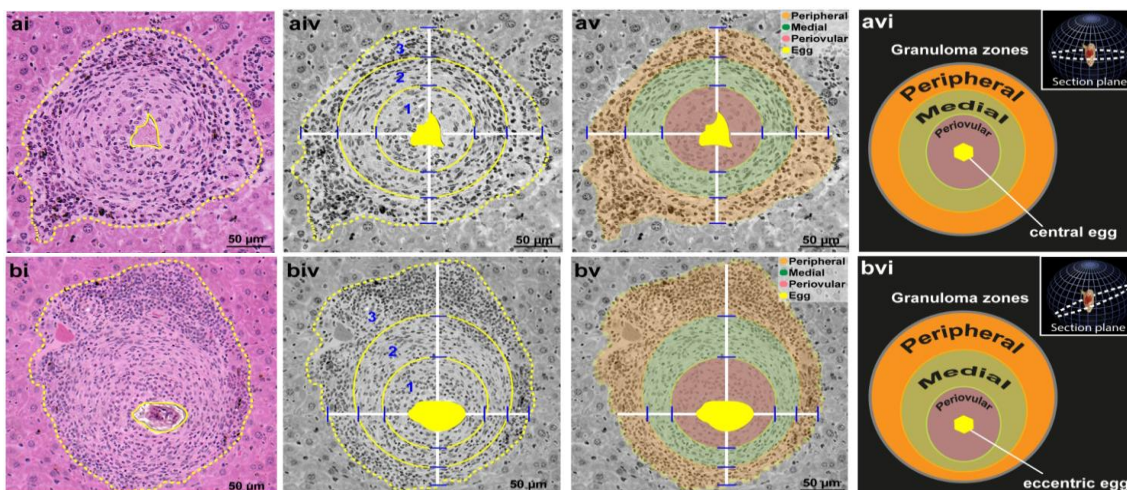


Figura 16: Metodologia para zonação dos granulomas. Os granulomas foram inicialmente delimitados (ai e bi), e duas linhas foram traçadas em um plano perpendicular, cruzando-se no centro do ovo (aiv e biv). Observe que uma das linhas deve passar pelo eixo principal do ovo. Em seguida, ao longo dessas linhas, a distância da casca do ovo até o limite do granuloma foi dividida em três partes iguais. Cada linha foi subdividida em três segmentos iguais, com pontos de divisão marcados ao longo de seu comprimento. Os pontos de divisão nas duas linhas foram então conectados, resultando na formação de três círculos concêntricos, que, por fim, estabeleceram as três zonas: periovarial, medial e periférica (av e bv). Assim, essas zonas foram identificadas de forma confiável em granulomas com ovos centrais (av e avi) ou excêntricos (bv e bvi). A área de cada zona foi determinada em cada granuloma. Fonte: Adaptado de Barata et al., 2025.

4.2.5.2. Quantificação de eosinófilos em granulomas

Para identificar e quantificar os eosinófilos em cada granuloma, imagens em alta resolução de cortes histológicos corados com FG&NR e adquiridos por digitalização de lâmina inteiras, foram manualmente contabilizados utilizando o software Histoquant (3D Histech kft., Budapeste, Hungria). Para identificação dessas células, foram consideradas suas características morfológicas típicas, como núcleo segmentado (corado em vermelho pelo NR) e citoplasma altamente acidofílico (destacado em verde pelo FG; Figura 6). Foram contabilizados i) o número total de eosinófilos em cada granuloma, bem como ii) o número de eosinófilos em cada uma das zonas espaciais do granuloma (Figura 16).

4.2.5.3. Análise quantitativa de MBP-1

Para as análises de imunofluorescência para MBP-1, as lâminas digitais obtidas por WSI foram submetidas à análise de imagem semi-automática, utilizando o software FIJI (National Institutes of Health, USA), para marcação de área total e de fração de densidade ótica. O

threshold foi fixado com limite inferior de 35 *pixels*, mantendo o limite superior no valor máximo da escala, e aplicado igualmente a todas as imagens para quantificação da área de imunomarcação.

Para quantificação de MBP-1 nas três zonas espaciais (periovular, medial e periférica), granulomas foram divididos manualmente conforme a metodologia de zonação adotada (Figura 16). A delimitação das zonas e a quantificação de MBP-1 por área de zona foi realizada no software FIJI (National Institutes of Health, USA), seguindo os critérios acima.

4.3. Citometria

4.3.1. Extração de células e Processamento para Citometria

Fragmentos de aproximadamente 2 cm das porções do intestino delgado (proximal, medial e distal) e do intestino grosso (proximal e distal) foram coletados, abertos longitudinalmente e lavados com tampão fosfato (pH 7,4, 0,1 M) para remoção das fezes, para os dois grupos: controle e infectado fase aguda (n=8). Os fragmentos foram cortados em pedaços menores até formar uma massa homogênea e colocados em uma solução de digestão enzimática por uma hora à 37° C. Em seguida, foram submetidos à uma digestão mecânica para dissociar os fragmentos restantes com uma seringa e, posteriormente, filtrados em filtro 40µm. O protocolo completo adaptado (Pecha, Martinez et al. 2024) neste trabalho para o processamento para citometria se encontra abaixo:

Obtenção de células intestinais para Citometria

- Coletar intestinos;
- Lavar e remover as fezes;
- Fragmentar em pequenos pedaços;
- Transferir para tubo com 10mL de Solução de Digestão*;
- Manter em agitação por 1 hora, à 37° C;
- Centrifugar (500G por 5 minutos) e descartar sobrenadante;
- Adicionar 10 mL de DMEM+10%SFB;
- Passar fragmentos em seringa;

- Filtrar em filtro 40mm;
- Centrifugar (500G por 5 minutos) e descartar sobrenadante;
- Ressuspender em 1mL DMEM+10%SFB;
- Contar com solução de Turk**;
- Adicionar 1 milhão células por poço em placa de 96mL;
- Centrifugar (800G por 5 minutos) e descartar sobrenadante;
- Adicionar 150mL de DMEM+10%SFB e repetir centrifugação;
- Adicionar 30mL da solução de anticorpos diluídos;
- Manter 25 minutos à 4° C;
- Centrifugar (800G por 5 minutos) e descartar sobrenadante;
- Adicionar 150mL de DMEM+10%SFB e repetir centrifugação;
- Adicionar 150mL de DMEM+10%SFB e adquirir no citômetro.

*Solução de Digestão:

Para 100mL de DMEM: 200U/mL de Colagenase I, 100U/mL de DNase I, 3,3mg CaCl₂, 1%SFB.

**Solução de Turk:

Para 100mL: 2mL ácido acético + 98mL água destilada + pitada de cristal violeta.

4.3.2. Leitura, marcação e análise da Citometria

A leitura foi realizada em citômetro CitoFLEX S (Beckman Coulter) e as análises foram realizadas no software CytExpert (Beckman Coulter) para o seguinte painel de anticorpos:

- CD45 BV650 (BD Biosciences): identificação de leucócitos;
- SiglecF PE/Cy7 (BD Biosciences): identificação de eosinófilos totais;
- CD11c APC/Cy7 (Invitrogen, eBioscienceTM; 11-0114-82): identificação de eosinófilos residentes do intestino;
- F4/80 PE/CF594 (BioLegend): identificação de eosinófilos regulatórios de perfil 1 (E1).

Relação Células-Fenótipo

Eosinófilos Totais: CD45+/ SiglecF+

Eosinófilos Residentes do intestino: CD45+/ SiglecF+/ CD11c+ (Spencer, Bonjour et al. 2014).

Eosinófilos de perfil 1 (E1): CD45+/ SiglecF+/ F4/80+ (Vieira, Almeida et al. 2025).

Eosinófilos de perfil 2 (E2): CD45+/ SiglecF+/ CD11c-/ F4/80-

4.4. Análises Estatísticas

As análises estatísticas e os gráficos foram feitos com a utilização do software GraphPad Prism® versão 10.6.1 (San Diego, CA, EUA). Os dados foram analisados em testes de médias em todas as comparações. O teste aplicado foi dependente da quantidade de médias e dos dados atenderem aos pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias. O grau de significância empregado para todas as análises foi de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Mapeamento de granulomas no intestino

5.1.1. O intestino delgado é o mais acometido pela inflamação granulomatosa

Para melhor entender a distribuição dos granulomas intestinais ao longo de todo o órgão, intestinos inteiros de camundongos Swiss Webster infectados experimentalmente por *S. mansoni* (n=5) foram processados para histopatologia. Ao todo, foram realizados 3 cortes semi-seriados (com intervalo de 300 μm entre eles) para cada fragmento do órgão, totalizando $51,5 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ de área tecidual analisada por WSI para o intestino inteiro (Tabela 2). Nessa área, foram contados um total 1.040 granulomas, correspondendo a $4,6 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ de área tecidual ocupada por granulomas (Figura 17Ai, Aii).

A maioria dos granulomas mostrou-se concentrada no intestino delgado (n=904), com menor número no intestino grosso (n=136). A área ocupada por granulomas no intestino delgado foi de $39,7 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ enquanto no intestino grosso correspondeu a $6,7 \times 10^6 \mu\text{m}^2$. Entretanto, quando analisado o tamanho médio dos granulomas nesses órgãos, observou-se que, apesar de em menor número e em menor área total ocupada pelos granulomas no intestino, o tamanho médio (área individual) dos granulomas do intestino grosso é significativamente maior em comparação com o dos granulomas observados no intestino delgado (Figura 17 Aiii).

Ao avaliar a densidade de granulomas por área tecidual, confirmou-se que o intestino delgado apresenta maior densidade de granulomas em comparação com o intestino grosso (Figura 17Bi). Ao se comparar as porções proximal, medial e distal do intestino delgado, não foram observadas diferenças significativas na densidade de granulomas. O mesmo foi observado ao comparar as porções proximal e distal do intestino grosso. Entretanto, a porção distal do intestino grosso apresenta menor densidade quando comparada à porção distal do intestino delgado (Figura 17Bii). O mesmo padrão foi observado ao analisar a proporção tecidual acometida pela inflamação granulomatosa (Figura 17 C, Ci-Cii). O intestino delgado apresentou maior proporção de área de granuloma por área de tecido, indicando ser mais acometido quando comparado com o intestino grosso (Fig. 17Ci).

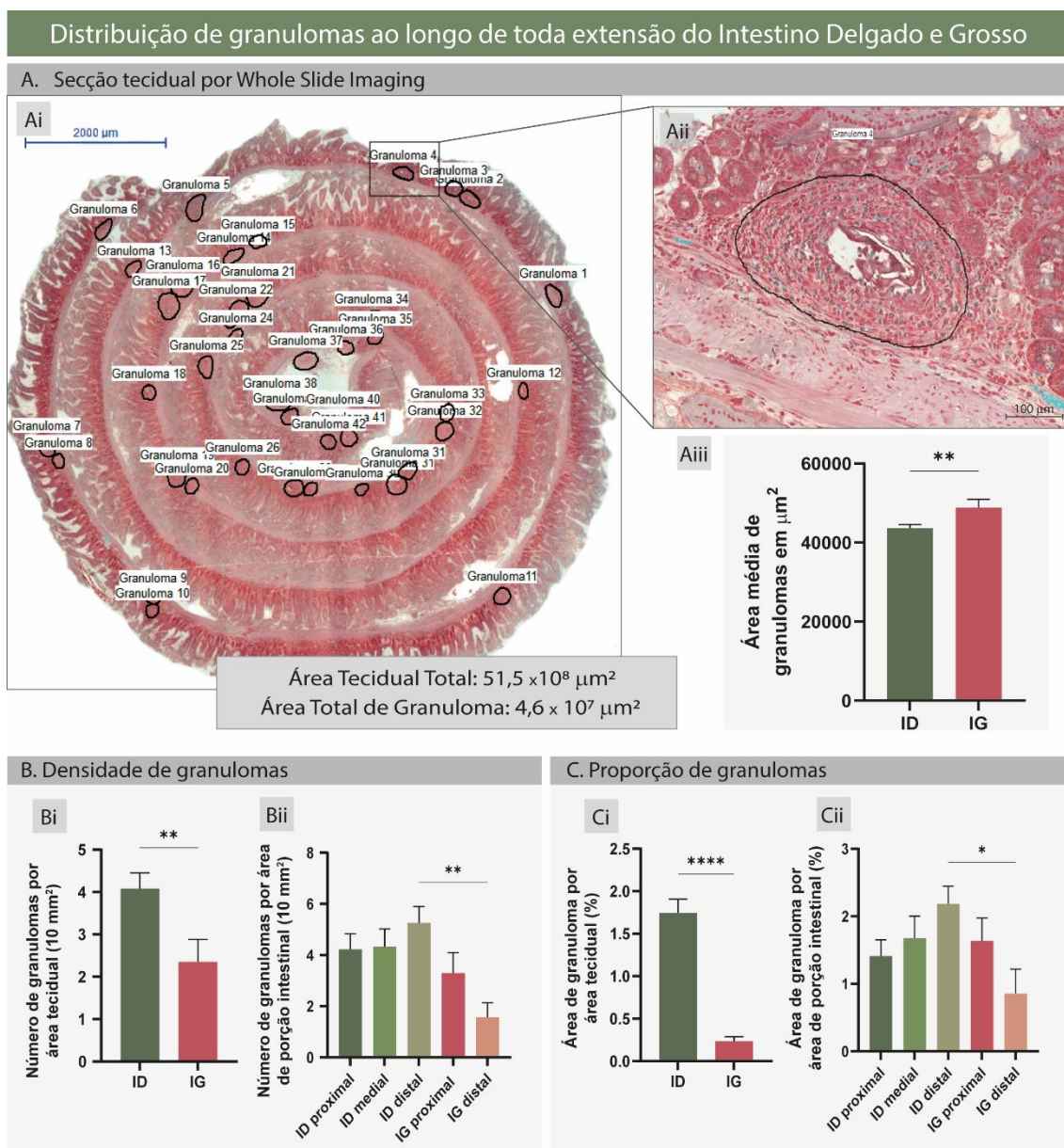


Figura 17: Distribuição de granulomas ao longo de toda extensão do intestino delgado e grosso. (A) Secção tecidual de intestino de camundongo Swiss Webster ($n=5$) infectado por *S. mansoni*, visto por WSI. (Ai, Aii) Secção tecidual com granulomas identificados por WSI. (Aiii) Área média dos granulomas intestinais. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. O valor de P indica o resultado dos testes de Mann-Whitney. (B) Avaliação do número de granulomas por área de tecido, para intestino delgado (ID) e intestino grosso (IG). (Bi); e para as porções dos ID e IG (Bii). (C) Avaliação da proporção de área de de granuloma por área de tecido, para os ID e IG (Ci); e para as porções dos ID e IG (Cii). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. O valor de P indica o resultado dos testes de Man-Whitney (Bi, Ci) e Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações (Bii, Cii). Considerou-se: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$, **** $P<0,0001$.

Durante o mapeamento dos granulomas em fragmentos de intestino por WSI, chamou a atenção a presença de ovos isolados dispersos na parede do órgão. Considerou-se como ovo isolado todo aquele que não estivesse circundado por um aglomerado característico de células

inflamatórias (Figura 18A) e, portanto, não representasse uma resposta inflamatória granulomatosa, mesmo em fase inicial (pré-granulomatosa típica).

Os ovos isolados foram contados (n=971) e classificados quanto à presença (n=813) ou ausência (n=158) de larva em seu interior (Figura 1B). Para melhor compreender a distribuição desses ovos ao longo de todo o intestino, foi avaliada a proporção do número de ovos por porção dos ID e IG. A proporção de ovos isolados, tanto com ou sem larva, mostrou-se maior nas porções proximais, tanto no ID, quanto no IG (Figura 18C).

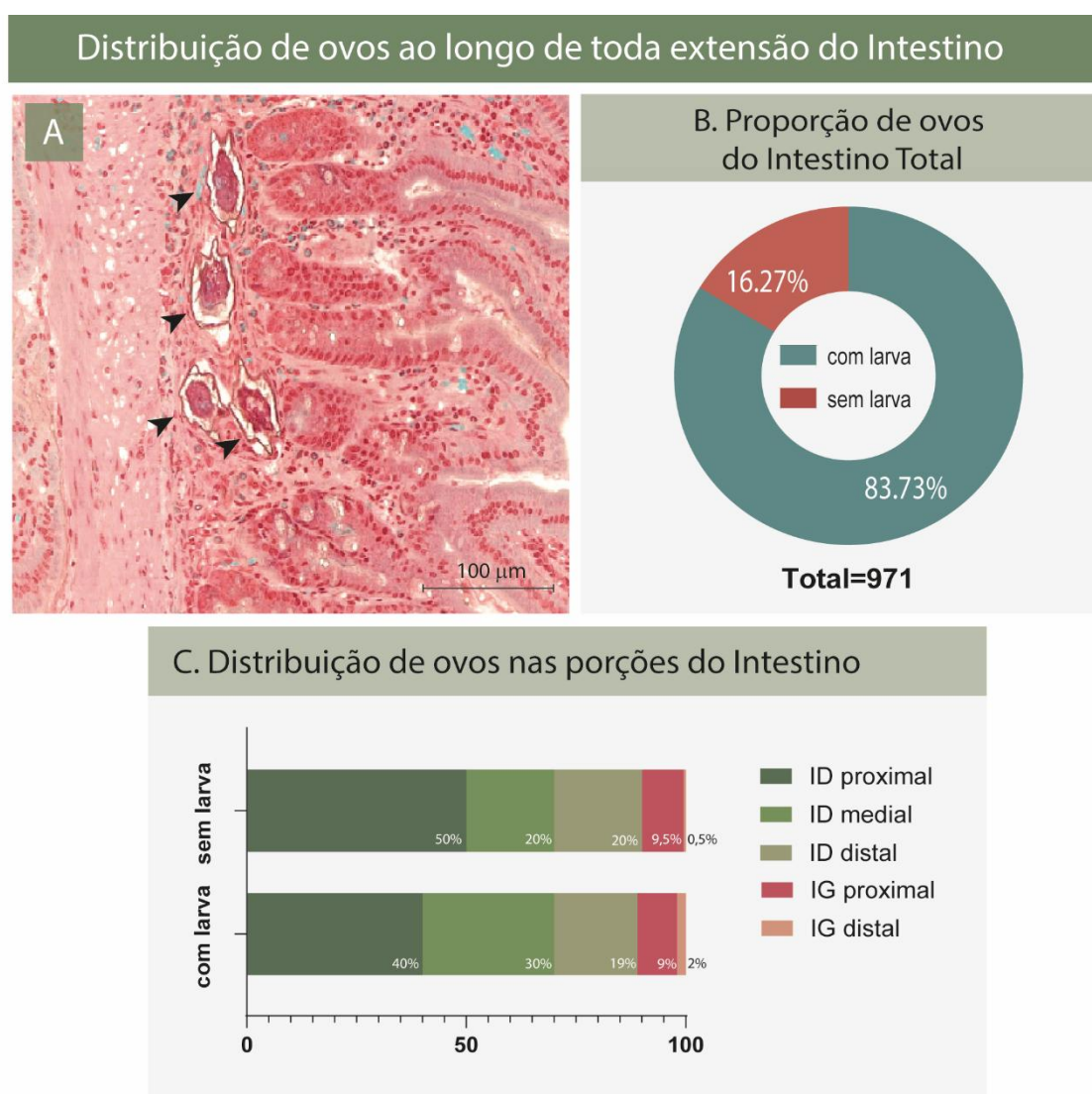


Figura 18: Distribuição de ovos isolados (sem reação granulomatosa) ao longo de toda extensão do Intestino Delgado (ID) e Grosso (IG). (A) Corte longitudinal, visto por WSI, da parede do intestino de camundongo Swiss Webster infectado por *S. mansoni*, com identificação de ovos isolados (cabeça de seta). Coloração de *Fast Green & Neutral Red*. (B) Frequência de ovos isolados ao longo de toda extensão do intestino. (C) Distribuição dos ovos isolados nas porções dos ID e IG.

5.1.2. Os granulomas estão localizados preferencialmente na submucosa intestinal

Para melhor entender a distribuição de granulomas ao longo da parede intestinal, os granulomas identificados foram avaliados de acordo com sua localização nas túnicas – mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figura 19 Aii, Aiii). No ID, os granulomas se encontram concentrados na submucosa (65% - Figura 19 Bi), com esse padrão perpetuando quando consideradas as porções – proximal, medial e distal (Figura 19 Bii). Entretanto, apesar de em maior número, quando avaliada a área média, os granulomas da mucosa apresentaram maior tamanho em relação aos da submucosa no ID (Figura 19 Biii). Para o IG, o mesmo padrão de concentração dos granulomas na submucosa foi observado (85%- Figura 19 Ci, Cii), porém sem diferença na média de tamanho dos granulomas entre as túnicas (Figura 19 Ciii). Nenhum granuloma foi observado na camada de serosa nos cortes de IG analisados (Figura 19 C).

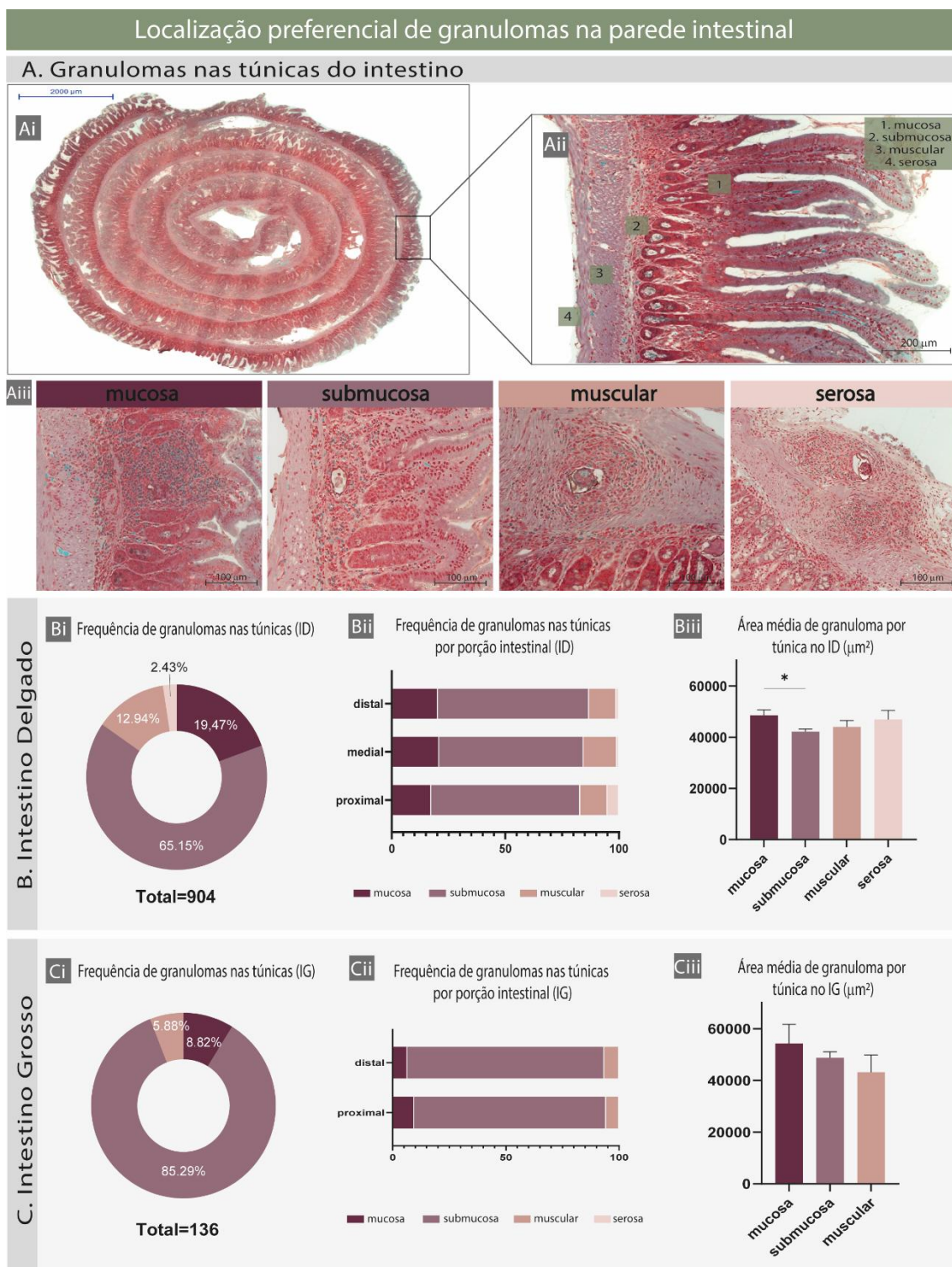


Figura 19: Localização preferencial de granulomas na parede intestinal. (A, Ai) Seção tecidual do intestino de camundongo Swiss Webster infectado por *S. mansoni* e processado através da técnica Swiss roll e visualizado por WSI. (Aii) Vista longitudinal da parede do intestino, corado com *Fast Green & Neutral Red*, seguido da identificação numérica das túnicas que compõem a parede do órgão. (Aiii) Granulomas em cada uma das túnicas da parede do intestino: mucosa, submucosa, muscular e serosa. (Bi, Ci) Frequência de granulomas em cada uma das túnicas da parede do ID e IG, respectivamente. (Bii, Cii) Frequência de granuloma em cada uma das túnicas da parede intestinal, por porção de ID e IG, respectivamente. (Biii, Ciii) Área média dos granulomas por túnica em ID e IG, respectivamente. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. (Ci, Di) O valor de P indica o resultado dos testes de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. Considerou-se: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

5.1.3. Granulomas intestinais constituem um sistema evolutivo dinâmico

A dinamicidade do granuloma é entendida por sua evolução morfológica. Tal evolução é observada através da caracterização dos estágios evolutivos desse microecossistema, classificados em duas fases principais: pré-granulomatosa e granulomatosa (Malta, Silva et al. 2021). Nesse trabalho, para adequar a classificação ao contexto intestinal, tornou-se necessária a adaptação dos critérios de caracterização dos estágios granulomatosos já descritos (Amaral, Silva et al. 2017). Uma vez que os granulomas intestinais são estruturas altamente dinâmicas, considerou-se tanto o caráter transitório do granuloma quanto os diferentes momentos evolutivos dentro de cada estágio, com suas respectivas alterações morfológicas.

O estágio pré-granulomatoso exsudativo (PE) é classicamente identificado com um aglomerado de células inflamatórias dispostas de forma desordenada ao redor do ovo do parasito e com pouca matriz extracelular (Figura 20 B) (Barata, 2025). No presente estudo, a análise detalhada de toda a extensão do intestino permitiu identificar duas subdivisões dentro do estágio PE. Inicialmente (PE inicial), o infiltrado inflamatório é robusto, com presença de pouco espaço intercelular. Mais tardiamente (PE tardio), o infiltrado mantém sua robustez, mas há formação de espaços intercelulares, marcando o início da organização dessas células, bem como a presença, em alguns casos, de necrose tecidual inicial (Figura 20 A).

O estágio necrótico-exsudativo (NE) caracteriza-se pela presença de necrose tecidual. Esse estágio foi identificado como um aglomerado de células inflamatórias dispostas de forma mais organizada ao redor do ovo do parasito, contendo alto número de necrose tecidual, podendo ser por ora disposta de forma central, mais próxima ao ovo e, por muitas vezes, disposta de forma difusa em toda a extensão do granuloma (Figura 20 B). Em um primeiro momento (NE inicial), o infiltrado inflamatório encontra-se em processo de organização, com presença de necrose mais concentrada em alguma região. Em um segundo momento (NE tardio), o infiltrado encontra-se mais organizado, com a necrose mais numerosa e mais distribuída por todo o granuloma (Figura 20 A).

O estágio exsudativo-produtivo (EP) foi identificado através da alta organização das células inflamatórias ao redor do ovo do parasito, apresentadas em menor número, embebidas em uma matriz extracelular mais bem definida (Figura 20 B). Inicialmente (EP inicial), as células se apresentam organizadas dispostas orbitalmente ao redor do ovo, porém com distribuição ainda homogênea e podendo conter necrose tecidual remanescente. Em um

segundo momento (EP tardio), as células apresentam-se em menor número e com máxima organização orbital ao redor do ovo. Nesse momento nenhuma necrose remanescente foi observada, o que caracteriza o ápice de maturação do estágio EP (Figura 20 A).

Importante ressaltar, que por se tratar de um trabalho realizado apenas durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni*, nenhum estágio produtivo (P), característico da infecção crônica esquistossomótica, foi observado. E, portanto, não foram descritos critérios de caracterização desse estágio para o contexto intestinal.

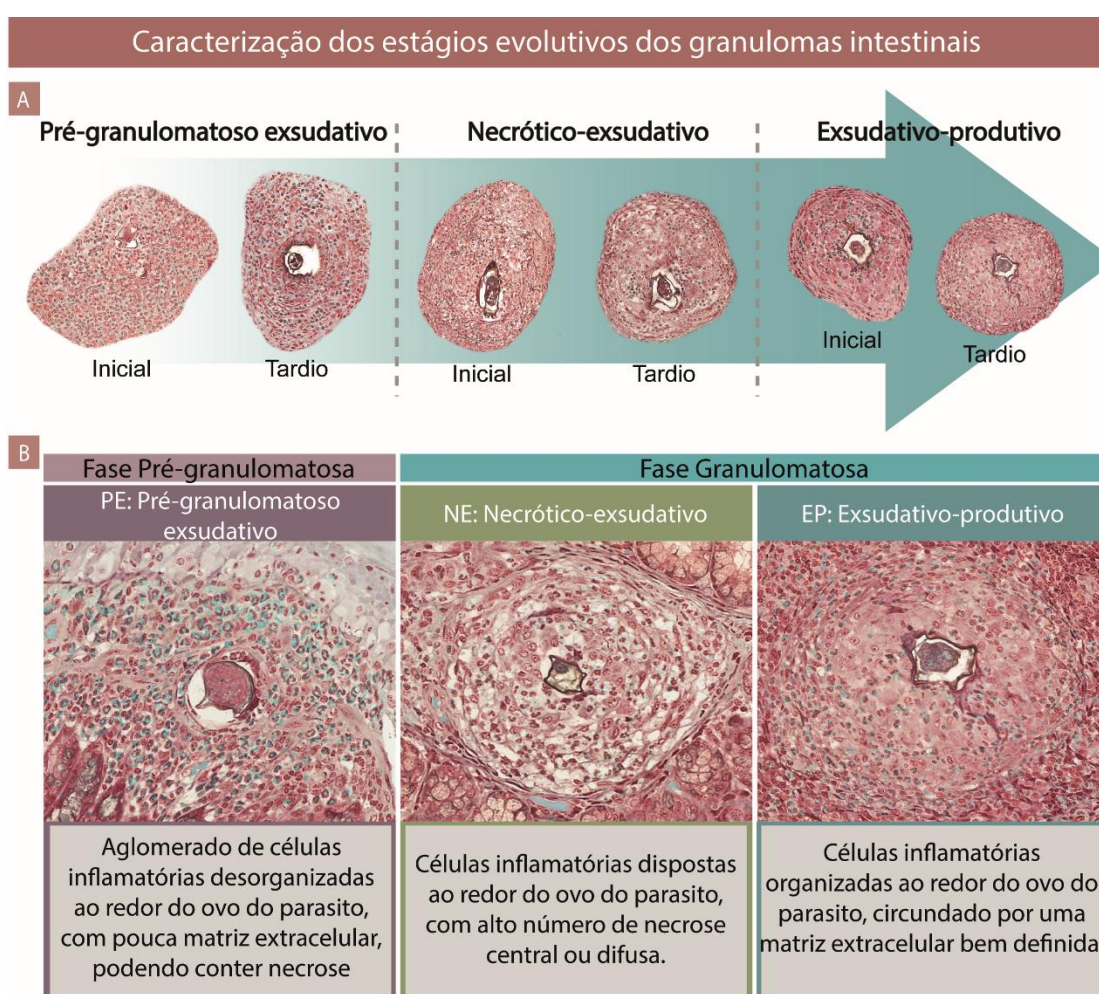


Figura 20: Caracterização dos estágios evolutivos dos granulomas intestinais. (A) Granulomas representativos do momento evolutivo dentro de cada estágio (inicial e tardio). (B) Granulomas representativos de cada estágio evolutivo encontrado no intestino de camundongos Swiss Webster infectados por *S. mansoni*.

5.1.4. O estágio PE predomina durante a infecção aguda intestinal por *S. mansoni*

Após elencar os critérios de caracterização dos estágios evolutivos dos granulomas, os mesmos foram contados em toda a extensão do intestino. Para essa análise, apenas os granulomas em que foi possível identificar o ovo foram utilizados nas contagens (n=556, sendo n=494 no ID e n=62 no IG). Cada granuloma foi classificado de acordo com os critérios estabelecidos para cada estágio (Figura 20), sendo categorizados em: PE (n=283, ID n=259 ID e IG n=24), NE (n=99, ID n=77 e IG n=22) e EP (n=174, ID n=158 e IG n=16).

Observou-se maior frequência do estágio inicial PE (Figura 21 A, Ai; PE=50,9%), ao longo de toda a extensão do intestino, seguido do estágio EP (Figura 21 A, Ai; EP=31,3%) e, por fim, do NE (Figura 21 A, Ai; NE=17,8%), que apresentou menor frequência. O mesmo padrão foi mantido apenas no ID (Figura 21 A, Aii, B, Bi; PE=52,4%, NE=15,6%, EP=32%). Já para o IG, observou-se alteração desse padrão, com maior frequência do estágio NE em relação ao EP (Figura 21 A, Aii, C, Ci; PE=38,7%, NE=35,5%, EP=25,8%).

Para melhor compreender a frequência dos estágios ao longo da extensão de cada intestino, foi avaliada a distribuição dos granulomas por porção. No ID, a frequência dos estágios manteve-se semelhante em todas as porções, porém com discreta concentração do estágio PE na porção proximal e do estágio EP na porção distal (Figura 21 B, Bii; PE= 57,9% - 50,4%, NE= 15,2% - 16%, EP= 26,9% - 33,8%). No IG, o padrão de frequências entre os estágios mostrou-se distinto. Enquanto na porção proximal do IG observou-se maior frequência do estágio NE, seguido do estágio PE (Figura 21 C, Cii; PE=34,7%, NE=42,9%; EP=22,4%), na porção distal do IG observou-se maior frequência do estágio PE, seguido do estágio EP (Figura 21 C, Cii; PE= 53,8%, NE=7,7%, EP=38,5%).

Ao avaliar a densidade de granulomas dentro de cada estágio evolutivo, o estágio PE foi significativamente maior quando comparado aos demais estágios (NE e EP) dentro do ID (Figura 21 Biii). Nesse segmento, o estágio PE se mostrou com maior densidade, seguido dos estágios EP e NE. Já no IG, não foi observado diferença no número de granulomas por área tecidual (densidade) entre os estágios (Figura 21 Ciii).



Figura 21: Frequência dos estágios evolutivos dos granulomas intestinais. (A) Representação gráfica da frequência dos estágios evolutivos de toda a extensão do intestino (Ai) e entre os ID e IG (Aii). (Bi, Biii) Representação gráfica da frequência dos estágios evolutivos no ID (Bi) e entre suas porções (Bii). (Ci, Cii) Representação gráfica da frequência dos estágios evolutivos no ID (Ci) e entre suas porções (Cii). (Biii, Ciii) Densidade de estágios evolutivos em granulomas intestinais. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. O valor de P indica o resultado dos testes de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. Considerou-se: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

5.2. Mapeamento de eosinófilos em granulomas intestinais

5.2.1. Eosinófilos colonizam robustamente granulomas PE tanto no ID como no IG

Uma vez avaliada a frequência dos estágios evolutivos dos granulomas, investigou-se a presença dos eosinófilos no microambiente granulomatoso intestinal. Ao todo, foram enumerados 90.505 eosinófilos em granulomas ao longo de toda extensão do ID e IG (Figura 22).

Os eosinófilos identificados no ID (n=79.095) apresentaram as seguintes proporções em tipos de granulomas: PE (58,6%), EP (23,9%) e NE (17,5%) (Figura 22 B, Bi). No IG (n=11.410), os eosinófilos também se distribuíram em maior proporção em granulomas do estágio PE (46,2%), seguido dos granulomas NE (36,6%) e EP (17,2%; Figura 22 B, Bii).

Ao se avaliar a distribuição de eosinófilos por área de granuloma, observou-se uma diminuição gradual da população de eosinófilos ao longo dos estágios evolutivos nos granulomas formados no ID (Figura 22 C, Ci). Já nos granulomas formados no IG, esse padrão de diminuição não foi observado (Figura 22 C, Cii). Quando essa mesma análise de número de eosinófilos por área granulomatosa foi realizada considerando simultaneamente os estágios evolutivos nos ID e IG, não foram observadas diferenças na população de eosinófilos entre nenhum dos estágios (Figura 22 C, Ciii). Assim, a população de eosinófilos mostrou-se constante entre os mesmos estágios evolutivos, independente do segmento intestinal.

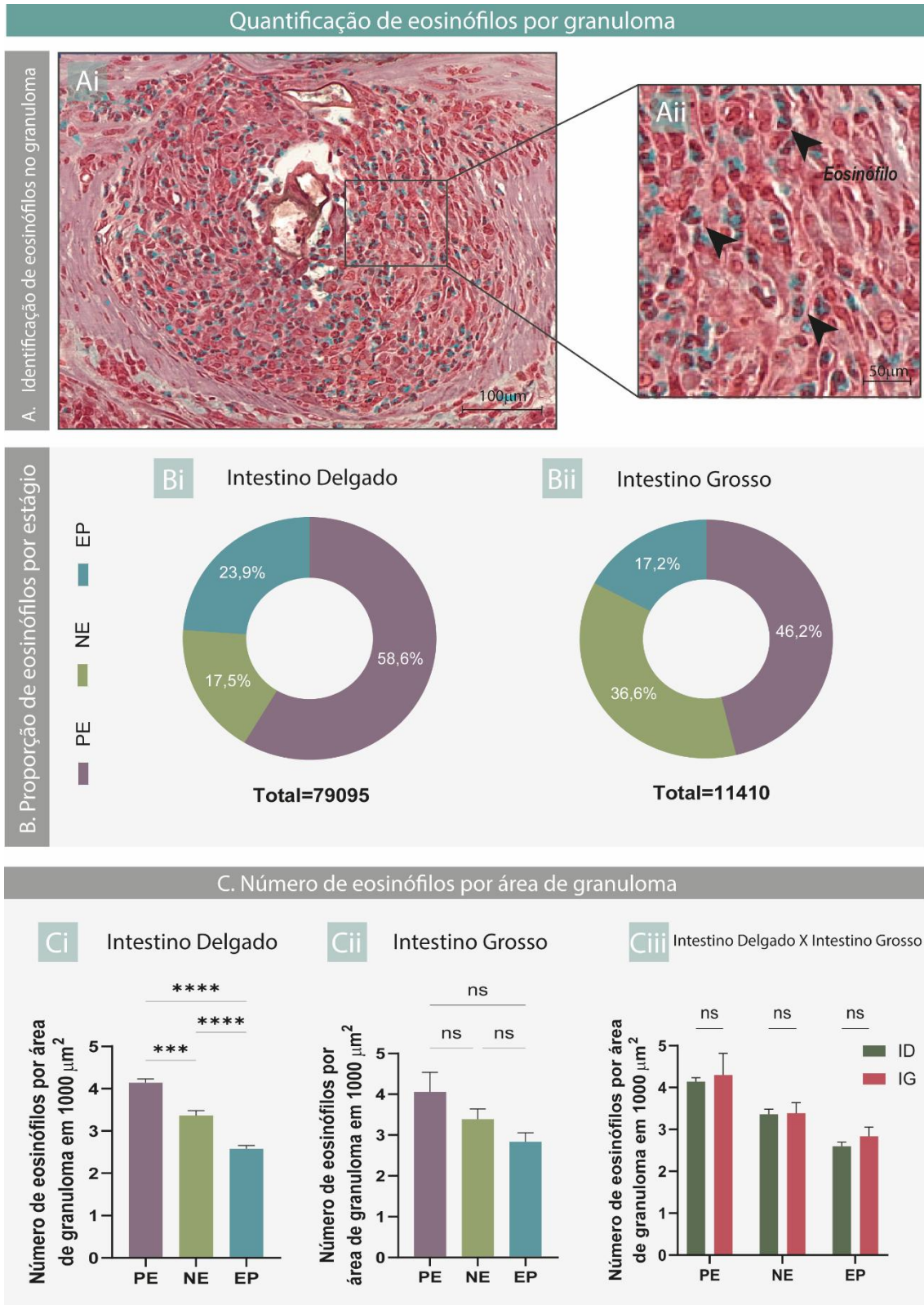


Figura 22: Quantificação de eosinófilos por granuloma. (A, Ai) Granuloma representativo corado com *Fast Green & Neutral Red*, apresenta os eosinófilos (Aii) destacados com citoplasma esverdeado (cabeças de setas). (B) Frequência de eosinófilos por estágio de granuloma no ID (Bi) e no IG (Bii). (C) Número de eosinófilos por área de granuloma no ID (Ci) e no IG (Cii). (Ciii) Número de eosinófilos por área de granuloma, comparando entre os estágios evolutivos, entre ID e IG. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. Considerou-se: ns: não significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

5.2.2. Eosinófilos concentram-se nas zonas medial e periférica dos granulomas maduros

Após a identificação da população de eosinófilos, buscou-se caracterizar a sua distribuição espacial no microambiente granulomatoso. Para isso, os granulomas da fase granulomatosa foram divididos em zonas espaciais – periovular, medial e periférica - de acordo com a metodologia adotada (Figura 23 A) (Barata, Malta et al. 2025). Inicialmente, a análise da distribuição dos eosinófilos entre as zonas revelou que a maior proporção dessas células no interior dos granulomas concentra-se na zona periférica, tanto para os granulomas do ID (Figura 23 B, Bi, Bii), quanto para os granulomas do IG (Figura 23 B, Biii, Biv).

Em contraste, ao se avaliar a densidade de eosinófilos por zona, considerando o número de células por área de zona, observou-se que a zona medial comporta a maior densidade dessas células em ambos os segmentos intestinais (Figura 23 C, Ci, D, Di). A densidade de eosinófilos também foi avaliada considerando em conjunto as zonas periovular e medial (Figura 23 Cii, Dii), e medial e periférica (Figura 23 Ciii, Diii) a fim de confirmar a predominância dessas células em regiões mais externas do granuloma, distantes do ovo (Figura 23 C, Cii; D, Dii). Essa predominância foi confirmada nos granulomas do ID (Figura 23 Cii, Ciii), porém não foi observada nos granulomas do IG (Figura 23 Dii, Diii).

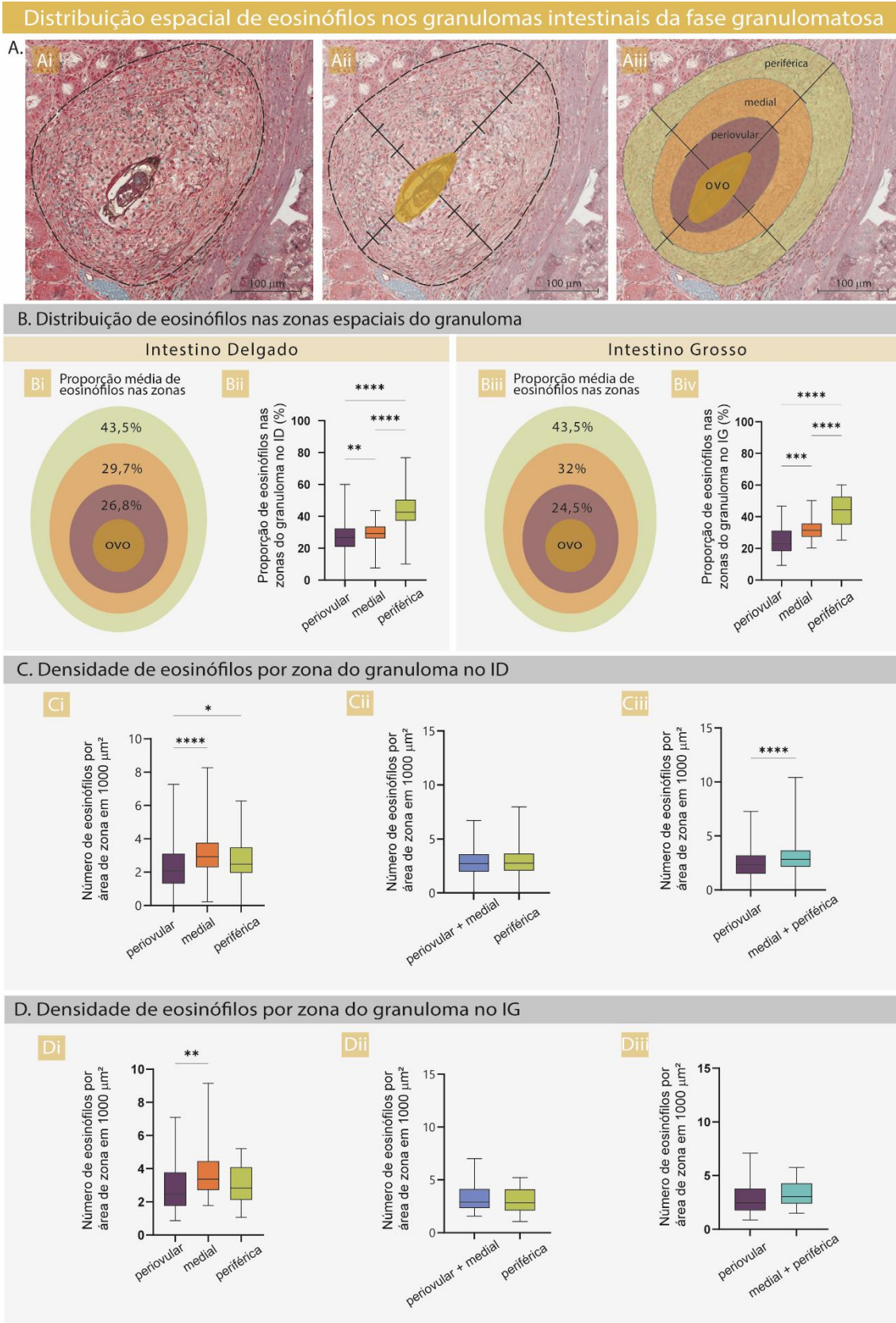


Figura 23: Distribuição espacial de eosinófilos nos granulomas intestinais da fase granulomatosa. (A) Representação esquemática do processo de marcação das três zonas espaciais (periovarial, medial e periférica) em um granuloma. Primeiro o granuloma é delimitado (Ai), posteriormente são traçadas duas linhas perpendiculares do centro do ovo à margem do granuloma (Aii), e a medida da casca do ovo até a margem é dividida em três partes simétricas para delimitação das zonas (Aiii). (B) Distribuição de eosinófilos nas zonas espaciais do granuloma nos

intestinos delgado e grosso (ID, IG). (Bi, Biii) Proporção de eosinófilos por zona nos ID e IG, respectivamente. (Bii, Biv) Proporção de eosinófilos nas zonas do granuloma nos ID e IG, respectivamente. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. O valor de P indica o resultado dos testes estatísticos de one-way ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações. (C-D) Densidade de eosinófilos por zona nos intestinos delgado (ID) e grosso (IG), respectivamente. (Ci-Ciii, Di-Diii) Densidade de eosinófilos por zona espacial do granuloma em ID e IG, respectivamente. Os resultados estão expressos em mediana e máximo/mínimo. (Ci, Di) O valor de P indica o resultado dos testes de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. (Cii-Ciii, Dii-Diii) O valor de P indica o resultado dos testes de Mann-Whitney. Considerou-se: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

5.2.3. MBP-1 predomina na zona periférica de granuloma intestinais

A proteína catiônica MBP-1 é classicamente reconhecida como um marcador tanto da localização de eosinófilos como da desgranulação dessas células (Barata, Malta et al. 2025). Para a distribuição espacial dessa proteína em granulomas intestinais, foram utilizadas áreas do intestino com maior densidade de granulomas (ID distal). Os granulomas foram divididos em i) Fase Pré-Granulomatosa e ii) Fase Granulomatosa, devido às dificuldades encontradas para classificação precisa de todos os estágios evolutivos na imunofluorescência, uma vez que não foi possível identificar áreas de necrose com a aplicação dessa técnica.

As análises revelaram uma diminuição significativa da proporção total de MBP-1 na fase granulomatosa em comparação com a pré-granulomatosa (Figura 24 B). Tal diminuição provavelmente está associada com a menor proporção de eosinófilos encontrada em granulomas maduros (fase granulomatosa; Figura 22 Ci).

Em seguida, buscou-se entender se nestes granulomas maduros (fase granulomatosa), caracterizados por uma organização definida das células, haveria também uma localização específica de MPB-1 como observado para granulomas hepáticos (Barata, Malta et al. 2025). As análises de imunomarcção por zona de granuloma mostraram que a zona periférica apresentou maior proporção de MBP-1 quando comparada com as demais zonas (medial e periovular) (Figura 24 C).

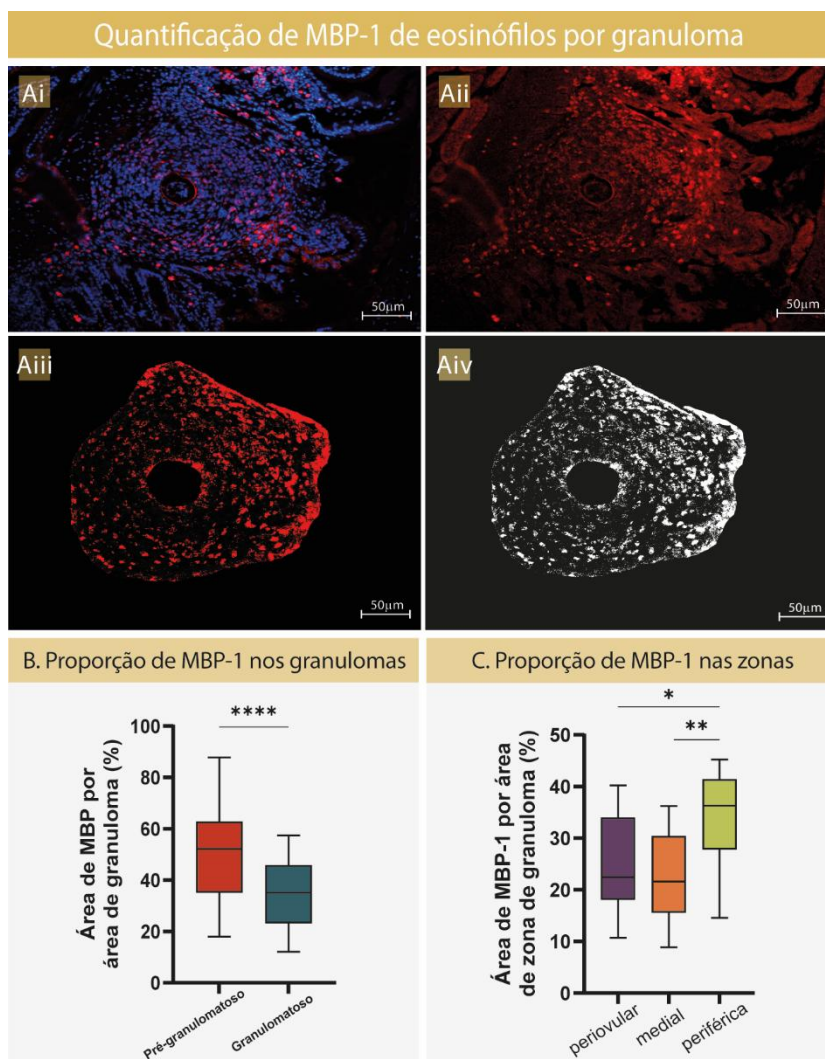


Figura 24: Quantificação de MBP-1 de eosinófilos por granuloma. (Ai-Aii) Fragmentos de intestino de camundongos Swiss Webster (n=3) infectados por *S. mansoni* foram processados para IF para marcação de MBP-1, identificado em vermelho por AF-546. Núcleos estão evidenciados com DAPI, em azul. (Aiii) Granulomas intestinais foram identificados, selecionados e isolados, com o fundo do tecido e seu ovo apagados no Adobe Photoshop. (Aiv) As imagens tratadas foram submetidas à análise de área de marcação por pixels no software FIJI. (B) Proporção de MBP-1 nos granulomas intestinais. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. O valor de P indica o resultado dos testes T de Student. (C) Proporção de MBP-1 nas zonas espaciais de granulomas. Os resultados estão expressos em mediana e máximo/mínimo. O valor de P indica o resultado dos testes de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. Considerou-se: * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; **** P<0,0001.

5.2.4. Eosinófilos CD34+ concentram-se nas zonas periféricas de granulomas intestinais

Após a identificação dos eosinófilos e da distribuição de sua proteína básica principal (MBP-1) nas zonas espaciais dos granulomas intestinais, buscou-se caracterizar os eosinófilos dentro desse contexto, de acordo com seu grau de maturidade. Para isso, as porções do ID com maior frequência de granulomas (ID distal) foram preparadas para imunomarcação de CD34 – importante marcador de eosinófilos imaturos comprometidos com a linhagem eosinofílica (Sergejeva, Johansson et al. 2004, Rådinger, Bossios et al. 2011). Foi observada positividade para CD34 mais acentuada na zona periférica, bem como sua co-localização com marcações de MBP-1, concentradas na periferia dos granulomas, onde apresentaram maior intensidade de marcação quando comparada com as demais zonas – periovular e medial (Figura 25). Conforme já conhecido, positividade também foi encontrada no endotélio de vasos seccionados, uma vez que CD34 é um marcador para células endoteliais (Arakelian, Lion et al. 2023). Os achados corroboram a ocorrência de maturação e diferenciação de eosinófilos em granulomas esquistossomóticos.

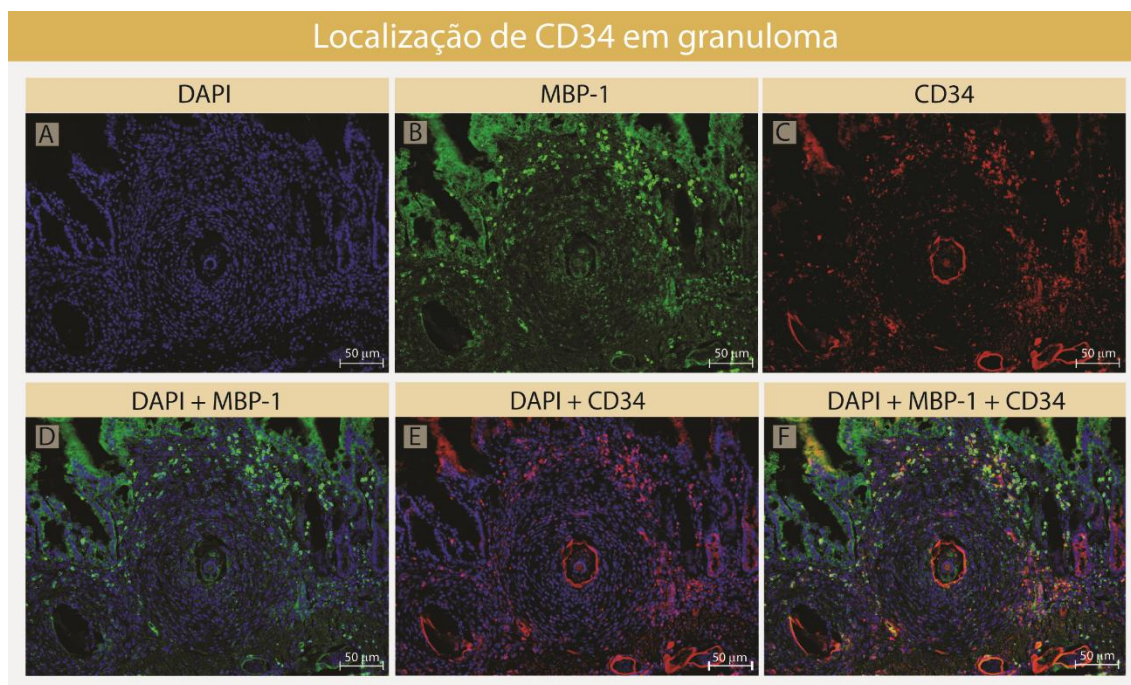


Figura 25: Distribuição de CD34 em granulomas intestinais. (A) Granuloma marcado com DAPI para identificação dos núcleos celulares. (B) Granuloma marcado com MBP-1 para identificação de eosinófilos. (C) Granuloma marcado com CD34 para identificação de eosinófilos imaturos comprometidos com a linhagem eosinofílica. (D) Granuloma visto com marcação de DAPI + MBP. (E) Granuloma visto com marcação de DAPI + CD34. (F) Granuloma visto com marcação de DAPI + MBP + CD34. Células endoteliais de vasos seccionados também mostram positividade para CD34.

5.2.5. Expansão e modulação fenotípica das subpopulações de eosinófilos ao longo do intestino durante a infecção por *S. mansoni*

Com intuito de melhor caracterizar o perfil imunológico dos eosinófilos ao longo das porções intestinais durante a infecção por *S. mansoni*, realizou-se análise por citometria de fluxo em animais controle e infectado na fase aguda (n=8). Para tanto, fragmentos intestinais foram processados para o posterior isolamento de células do intestino. Durante esse procedimento, foram coletadas células de todas as túnicas intestinais, incluindo as células que compõem os granulomas nos animais do grupo infectado.

Inicialmente, os leucócitos foram identificados por meio da marcação para CD45+ e, partir desse *gate*, as células SiglecF+ foram selecionadas, correspondendo à população total de eosinófilos. Observou-se que a população de eosinófilos totais apresentou aumento expressivo em todas as porções do ID no grupo infectado (33,6%-38,8%; Figura 26 B), bem como para a porção proximal do IG (14,6%; Figura 26 B), quando comparado ao grupo controle (7,3%-15,5%; Figura 26 B). Em contraste, não foi observada diferença significativa na porção distal do IG (Figura 26 B). Esses dados revelam que há um aumento global de eosinófilos durante a infecção aguda por *S. mansoni*.

Após a identificação dos eosinófilos totais, procedeu-se a análise de suas subpopulações no contexto da infecção, a fim de compreender o remodelamento fenotípico dessas células. Investigou-se a ocorrência das seguintes subpopulações: Eosinófilos residentes (CD45+/SiglecF+/CD11c+); Eosinófilos de perfil 1 (E1; C45+/SiglecF+/F4/80+); Eosinófilos de perfil 2 (E2; CD45+/SiglecF+/CD11c-/F4/80-).

Os eosinófilos residentes do intestino foram caracterizados pela expressão de CD45+/SiglecF+/CD11c+. Essa subpopulação apresentou-se maior no grupo controle (78,8%-91,4%; Figura 26 C), em relação ao grupo infectado em todas as porções dos ID (38,7%-44,9%) e IG (47,8% e 52,3%). Esses achados evidenciam uma redução de aproximadamente metade da expressão de CD11c+ no eosinófilos nos animais infectados em relação aos controles (Figura 26 C).

A subpopulação de eosinófilos de perfil 1 (E1) foi identificada pela expressão de CD45+/SiglecF+/F4/80+. Essa subpopulação se apresentou reduzida no grupo controle (0,06%-1,45%; Figura 26 D), enquanto, nos animais do grupo infectado, observou-se um aumento progressivo ao longo das porções do ID (7,5%-13,5%; Figura 26 D), bem como um aumento

expressivo nas porções do IG (18,3%-23,7%; Figura 26 D), com destaque para a porção distal desse segmento. Esses achados indicam um aumento progressivo desse fenótipo eosinofílico durante a infecção.

Para identificação do perfil clássico de eosinófilos (E2), utilizou-se a caracterização através da expressão por CD45+/SiglecF+/CD11c-/F4/80-. Embora essa subpopulação estivesse presente em menores proporções nos animais controle (8,4%-18,6%; Figura 26 E), observou-se um aumento significativo dessa subpopulação nos animais infectados em todas as porções do ID (42%-49,9%; Figura 26 E) e na porção proximal do IG (33,8%; Figura 26 E). Contudo, não houve diferença significativa na porção distal do IG (Figura 26 E). Observa-se, portanto, uma distribuição diferencial das subpopulações E1 e E2 ao longo das porções intestinais durante a infecção.

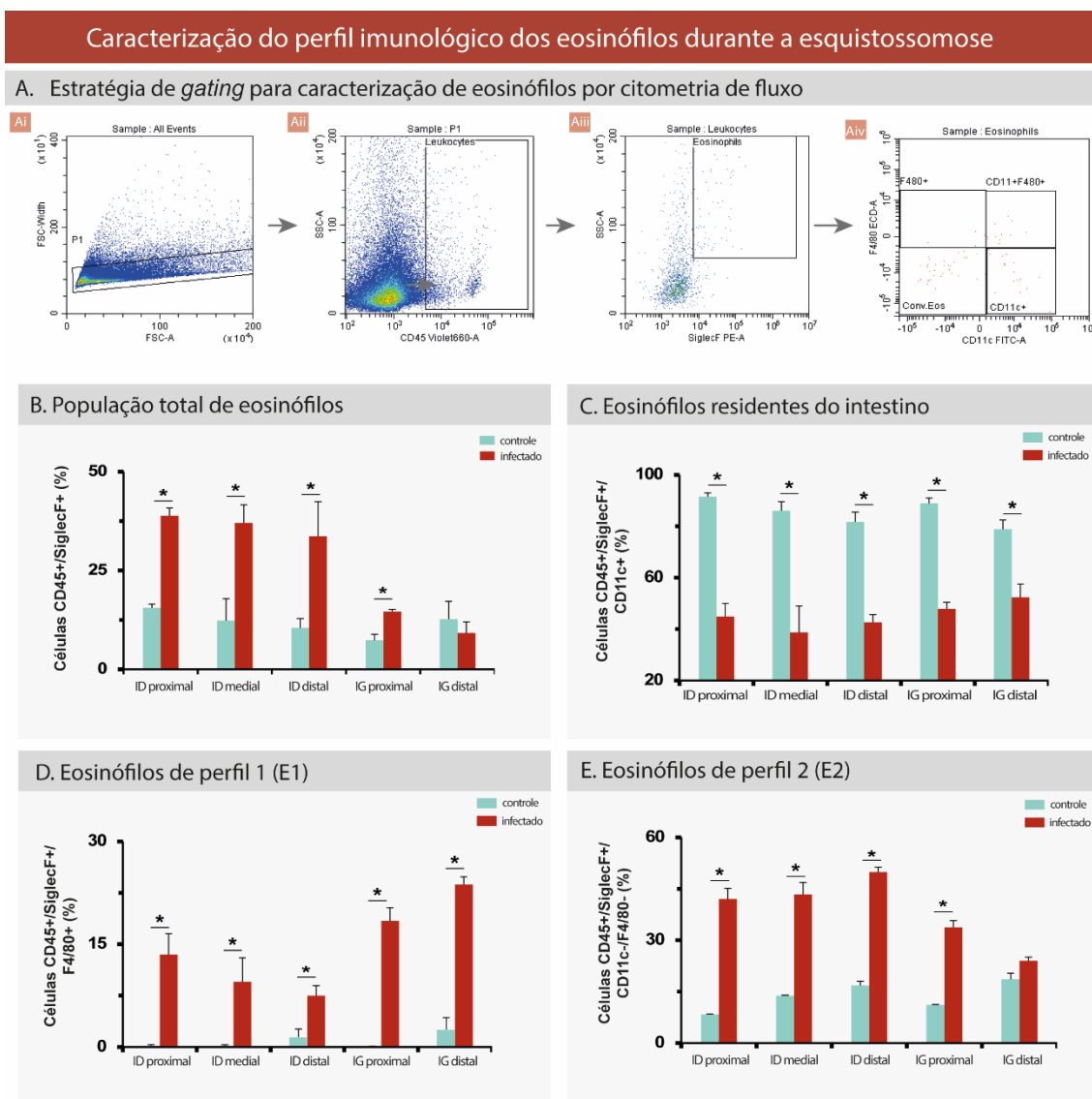


Figura 26: Caracterização do perfil imunológico dos eosinófilos durante a esquistossomose. (A) Estratégia de *gating* para caracterização de eosinófilos por citometria de fluxo, de células isoladas do intestino delgado e grosso de camundongos Swiss Webster infectados por *S. mansoni* (n=8). Todos os eventos foram identificados e os eventos duplos foram excluídos com base nos gráficos de dispersão FSC-A versus FSC-W (Ai). Os leucócitos foram identificados por *gating* em células CD45+ (Aii). Dentro da população de CD45+, a expressão de SiglecF+ foi utilizada para identificar a população total de eosinófilos (Aiii). A partir dos eosinófilos totais, as expressões de CD11c e F4/80 foram utilizadas para identificar os diferentes fenótipos eosinofílicos (Aiv). (B-E) Análise por citometria de fluxo de eosinófilos isolados do ID e IG de camundongos Swiss Webster infectados por *S. mansoni* (n=8). (B) Frequência de eosinófilos totais pela expressão de SiglecF+ dentro do total de células CD45+. (C) Frequência de eosinófilos CD11c+ dentro da população total de eosinófilos (CD45+/SiglecF+). (D) Frequência de eosinófilos F4/80+ dentro da população total de eosinófilos (CD45+/SiglecF+). (E) Frequência de eosinófilos CD11c-/F4/80- dentro da população total de eosinófilos (CD45+/SiglecF+). Para todos os painéis, a análise estatística foi realizada utilizando o teste one-way ANOVA, com correção de Bonferroni, e teste T de Student; cada gráfico de barras representa a média \pm erro padrão dos dados de n=4 camundongos por grupo experimental (controle e infectado). *P < 0,01.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o ID é significativamente mais acometido pela inflamação granulomatosa que o IG durante a infecção aguda murina por *S. mansoni*. Entretanto, os granulomas do IG apresentaram-se com maior área média em relação aos granulomas do ID. Esses resultados podem ser explicados de acordo com a natureza das diferenças intrínsecas à cada segmento intestinal. Enquanto no ID há presença de vilosidades e de uma fina camada da parede do órgão, no IG há ausência de vilosidades, aumento do número de células caliciformes e de uma parede mais espessa (Bowcutt, Forman et al. 2014). Essas características tornam plausível que o trânsito dos ovos através da parede do IG aconteça de forma mais lenta, devido às particularidades elencadas, permitindo a maior infiltração de células imunes para formação dos granulomas, o que pode ocasionar o aumento da área dos mesmos.

As fêmeas de *S. mansoni* depositam seus ovos na circulação mesentérica, especialmente em ramos venosos nas proximidades do intestino (Colley, Bustinduy et al. 2014). Esses ovos atravessam a parede intestinal em direção ao lúmen para serem liberados nas fezes, dando continuidade ao ciclo do parasito (Schwartz and Fallon 2018). Considerando que as túnicas mucosa e submucosa são regiões altamente vascularizadas, com destaque para a rica rede de vasos presentes na submucosa, é plausível que essa característica anatômica favoreça a deposição dos ovos nesse local, justificando a localização preferencial de granulomas nessa camada. Por outro lado, a presença de granulomas com maior área na túnica mucosa no ID, pode estar relacionada à presença de vilosidades na parede intestinal, que aumenta a área dessa túnica, onde ocorre a etapa final do deslocamento para liberação dos ovos em no lúmen (Chuah, Jones et al. 2014). Nessa região, a resposta granulomatosa pode contribuir mecanicamente para a expulsão dos ovos, sugerindo que esses granulomas estejam funcionalmente associados à liberação desses ovos.

Estudos prévios indicam que apenas ovos maduros são eliminados junto às fezes do hospedeiro definitivo (Takaki, Rinaldi et al. 2021). Através da liberação dos antígenos solúveis (SEA), secretados pela larva miracídio pelos poros do ovo, tais moléculas atraem células inflamatórias responsáveis por iniciar a formação dos granulomas (Gryseels, Polman et al. 2006, Hams, Aviello et al. 2013, Chuah, Jones et al. 2014). Os resultados da observação de ovos isolados, encontrados majoritariamente no ID, principalmente nas porções proximal e medial, enquanto encontrados em menor proporção no ID distal, sugerem que as larvas dos ovos que alcançam as regiões mais proximais do intestino – onde foi encontrada a maior frequência de

ovos isolados – ainda não estejam completamente maduras. A maturação e a consequente liberação de antígenos seriam determinantes para a ativação do sistema imune e para o estabelecimento da resposta granulomatosa (Costain, MacDonald et al. 2018).

Adicionalmente, a menor presença de ovos isolados nas demais porções (ID distal, IG proximal e IG distal) pode estar relacionada com a natureza da parede do intestino. Para suportar essa hipótese, é necessário considerar novamente as particularidades da natureza do tecido. O ID é anatomicamente dividido em três regiões — duodeno, jejuno e íleo. A partir do íleo, são encontradas estruturas de tecido linfóide associados à mucosa (MALT), como as PP, constituídas por aglomerados organizados de células imunes responsáveis pela vigilância e homeostase intestinal (Turner, Narang et al. 2012). Sendo essa região particularmente rica em células do sistema imune, é plausível que a resposta inflamatória frente à infecção seja mais intensa. Foi mostrado que o *S. mansoni* explora as PP como rota preferencial para a liberação de ovos (Turner, Narang et al. 2012). Esse cenário poderia explicar a menor proporção ovos isolados nas porções que comportam as PP.

Os granulomas constituem um ecossistema dinâmico, que sofre mudanças ao longo do tempo (Malta, Silva et al. 2021). Para granulomas hepáticos, está bem estabelecida a classificação desses sistemas em fase pré-granulomatosa, com estágio PE, e em uma fase granulomatosa, com os estágios NE, EP, e envolvendo para um estágio P (Amaral, Silva et al. 2017, Malta, Silva et al. 2021, Malta, Palazzi et al. 2022, Barata, Malta et al. 2025). Conforme estudos anteriores do grupo, essa classificação pode também ser aplicada para granulomas formados em outros órgãos-alvo, como o intestino (Amaral, Silva et al. 2017). No entanto, sugere-se que os granulomas intestinais e hepáticos apresentam características próprias (Weinstock and Boros 1983). Granulomas hepáticos falham em eliminar os ovos do parasito, os quais permanecem aprisionados no tecido hepático. Tal retenção permite a evolução dos granulomas hepáticos para estágios granulomatosos mais avançados, onde há maior deposição de matriz extracelular rica em colágeno, principalmente na fase crônica da doença (Amaral, Silva et al. 2017). Já no intestino, os granulomas esquistossomóticos são associados com a liberação dos ovos (Schwartz and Fallon 2018). Consequentemente, é de se esperar que granulomas em estágios evolutivos mais maduros sejam encontrados em menor proporção no intestino (Chuah, Jones et al. 2014, Schwartz and Fallon 2018). Nossos dados mostraram exatamente isso — maior proporção de granulomas em estágios iniciais de formação (PE). Enquanto o estágio PE é o mais frequente nos ID e IG, conforme aqui demonstrado, granulomas NE predominam no fígado durante a infecção aguda experimental (Amaral, Silva et al. 2017,

Malta, Palazzi et al. 2022, Barata, Malta et al. 2025). Nos intestinos, a predominância de granulomas imaturos (PE), onde há maior infiltração celular e menor deposição de matriz extracelular e, portanto, mais maleáveis, pode ser um fator importante para auxiliar na translocação do ovo pela parede intestinal (Silva 1998, Schwartz and Fallon 2018) e dar continuidade ao ciclo do parasito.

O mapeamento detalhado de toda a extensão intestinal permitiu evidenciar o caráter dinâmico dos granulomas esquistossomóticos e caracterizar subdivisões iniciais e tardias de cada estágio, além de algumas particularidades. Destacou-se a robusta presença de necrose em granulomas NE que, diferentemente dos hepáticos, apresentam-se numerosos e majoritariamente de forma difusa no granuloma. Além disso, foi possível observar também áreas iniciais de necrose em granulomas tipicamente da fase PE, indicando uma subdivisão tardia do estágio PE; bem como em granulomas tipicamente EP, indicando uma subdivisão inicial desse estágio. Sabe-se que a necrose tecidual em granulomas hepáticos é periovular em resposta aos antígenos hepatotóxicos liberados pela larva miracídio (Amaral, Silva et al. 2017).

No contexto intestinal, a rica presença de necrose tecidual pode estar associada à morte das células epiteliais durante a formação da resposta granulomatosa responsável pela translocação dos ovos pela parede do órgão. Curiosamente, NE foi o segundo estágio mais frequente no IG. Considerando-se a hipótese apresentada anteriormente em relação a composição tecidual desse seguimento, que resultaria no trânsito mais lento dos ovos em direção ao lúmen, a frequente presença de necrose característica desse estágio pode estar associada a uma adaptação aos obstáculos intrínsecos do órgão para transportar os ovos pela parede do IG. Enquanto no ID o segundo estágio mais encontrado foi o EP, indicando a formação de granulomas maduros de ovos que possivelmente não obtiveram sucesso em alcançar o lúmen e completar o seu ciclo. Estudos futuros poderão complementar a caracterização desses estágios partir da identificação detalhada das populações celulares e dos componentes de MEC, elucidando o possível papel de cada um dos estágios no contexto intestinal.

Os eosinófilos colonizam robustamente os granulomas formados durante a infecção por *S. mansoni*. A eosinofilia, tanto sanguínea como tecidual, é uma característica marcante durante a esquistossomose mansônica. Estudos prévios demonstram que, durante a fase aguda, os eosinófilos podem representar até 60% das células presentes em granulomas hepáticos (Amaral, Silva et al. 2017, Malta, Palazzi et al. 2022).

No presente trabalho, foi observado uma rica população de eosinófilos em granulomas PE - estágio mais frequente encontrado. No ID, essa população apresentou redução progressiva ao longo dos estágios evolutivos, evidenciando o caráter dinâmico da participação dos eosinófilos em paralelo à maturação granulomatosa. Esse achado reforça a ideia de que os eosinófilos se reorganizam à medida que o granuloma evolui. Além disso, evidencia um padrão semelhante aos observados em granulomas hepáticos (Barata, Malta et al. 2025), sugerindo que a dinâmica de colonização dessas células possa seguir princípios semelhantes nos diferentes órgãos. No IG, não foram observadas diferenças significativas na densidade de eosinófilos entre os estágios e, considerando o intestino como um todo, a população de eosinófilos se mantém constante em granulomas maduros.

Após a quantificação da população eosinofílica, buscou-se caracterizar a distribuição dessas células no interior de granulomas em estágios maduros, por apresentarem maior organização estrutural e compartimentalização celular. Estudos prévios do grupo utilizando uma estratégia de zonação em cada granuloma individualizado demonstraram localização preferencial de eosinófilos na zona periférica de granulomas hepáticos (Barata, Malta et al. 2025). No presente trabalho, foi observado padrão semelhante no intestino, com maior proporção de eosinófilos concentrada nas zonas periféricas de granulomas intestinais maduros. Ao considerar o número de eosinófilos em relação à área de cada zona, a densidade dessas células se mostrou superior na zona medial. Análises combinadas das zonas periovular+medial e medial+periférica, reforçaram a localização preferencial dos eosinófilos mais externamente no granuloma, indicando que essas células ocupam um nicho espacial nas zonas medial e periférica em granulomas intestinais.

Para aprofundar a compreensão funcional dessa distribuição, foram realizadas imunomarcações para MBP-1, proteína catiônica classicamente reconhecida como marcador tanto da localização de eosinófilos como da desgranulação destas células (Barata, Malta et al. 2025). Nos granulomas maduros (fase granulomatosa), a maior proporção de MBP-1 concentrou-se na periferia em comparação com as demais zonas, confirmando a localização preferencial de eosinófilos nessa zona.

Marcações com CD34 - importante marcador de eosinófilos imaturos comprometidos com a linhagem eosinofílica (Sergejeva, Johansson et al. 2004) - associados às marcações de MBP-1, revelaram co-localização e concentração da positividade dessas marcações nas zonas periféricas, corroborando a ocorrência de maturação e diferenciação de eosinófilos em granulomas esquistossomóticos.

Em conjunto, esses achados alinham-se aos previamente descritos no fígado (Barata, Malta et al. 2025), sugerindo que os eosinófilos apresentam um nicho ecológico nas zonas mais periféricas de granulomas intestinais maduros. O termo “nichos ecológicos” abrange um microambiente específico, no qual as células podem se estabelecer, diferenciar e interagir com outras populações celulares (Malta, Silva et al. 2021, Barata, Malta et al. 2025), podendo ser utilizado para caracterizar a compartimentalização espacial dos eosinófilos demonstrada. A predominância de eosinófilos em áreas distantes dos ovos desafiando a visão clássica de que os eosinófilos atuam exclusivamente como ‘matadores de helmintos’ durante a resposta granulomatosa, apontam para um papel potencialmente mais complexo na organização e modulação do microambiente inflamatório.

A partir desses achados, surgiu a seguinte questão: como se caracteriza o perfil fenotípico dos eosinófilos durante a infecção intestinal por *S. mansoni*?

Para responder a essa pergunta, subpopulações de eosinófilos foram identificadas por citometria de fluxo, a partir do homogenato das porções intestinais analisadas. É importante ressaltar que para essas análises não foi possível isolar especificamente as células dos granulomas. Dessa forma, as análises fenotípicas foram realizadas considerando a população total de eosinófilos presente nas amostras, englobando tanto aqueles localizados nos granulomas quanto os presentes no tecido intestinal.

Sabe-se que os eosinófilos são encontrados predominantemente no trato gastrointestinal e estão entre os leucócitos residentes intestinais mais abundantes, podendo ocupar cerca de 20-30% dos leucócitos totais encontrados na lâmina própria (Weller and Spencer 2017). Em condições inflamatórias, os eosinófilos podem sofrer remodelamento fenotípico e expandir sua população por meio do recrutamento de novos eosinófilos da circulação, modificando sua atuação no microambiente intestinal (Weller and Spencer 2017). Os primeiros resultados dessa análise revelaram um aumento expressivo na população total de eosinófilos (SiglecF+) no contexto da infecção, quando comparado aos animais controle, indicando a intensa infiltração de novos eosinófilos para o órgão.

Ao analisar os eosinófilos residentes do intestino, tipicamente marcados com CD11c (Larsen, Dockstader et al. 2022), observou-se que a proporção desse fenótipo eosinofílico foi significativamente menor em comparação à proporção apresentada nos animais controle. Esse achado sugere que, frente aos estímulos inflamatórios desencadeados pela infecção parasitária, há predominância de eosinófilos infiltrantes no intestino, recrutados a partir da circulação. Além

disso, indica um possível remodelamento fenotípico dos eosinófilos residentes, que podem perder a expressão de CD11c, refletindo adaptação ao contexto inflamatório.

Estudos recentes propõem a subdivisão funcional dos eosinófilos em dois perfis: eosinófilos do tipo 1 (E1) e eosinófilos do tipo 2 (E2), sugerindo que estímulos diferentes podem direcionar vias distintas em eosinófilos (Dolitzky, Shapira et al. 2021, Dolitzky, Hazut et al. 2022). Os E1 estariam associados à resposta do tipo Th1, induzidos sob estímulos do IFN- γ . Esse perfil estaria relacionado à potencialização de mecanismos da imunidade inata, apresentando caráter pró-inflamatório e imunoregulador, com liberação de mediadores de resposta do tipo 1, como IL-12. Por outro lado, os E2 estariam associados à resposta do tipo Th2, induzidos sobre estímulos de IL4. Esse perfil apresenta caráter mais anti-inflamatório, associado à modulação e resolução da inflamação, com liberação de mediadores de resposta tipo 2 como IL-4, IL-10 e IL-13 (Dolitzky, Shapira et al. 2021, Dolitzky, Hazut et al. 2022).

Diante desse cenário, buscou-se caracterizar os perfis de eosinófilos intestinais durante a infecção aguda por *esquistossomose mansoni*. Os resultados revelaram aumento significativo de eosinófilos E1 nos animais infectados em comparação aos animais controle, nos quais essa subpopulação estava praticamente ausente. De modo semelhante, também foi observado aumento significativo de eosinófilos E2 nos animais infectados em comparação à proporção encontrada no controle. A dinâmica dessas subpopulações ao longo das porções de ID e IG, apresentou-se inversamente proporcional. Enquanto foi observado tendência à redução de E1 nas porções do ID, observou-se crescimento de E2 nessas porções. Ao passo que, enquanto foi observado tendência ao crescimento da subpopulação de E1 nas porções do IG, observou-se uma diminuição no IG proximal.

Interessantemente, as porções ID distal e IG distal, onde foram encontradas diferenças de densidade e proporção de granulomas, também apresentaram modulação fenotípica eosinofílica distinta. No ID distal, porção que apresentou maior frequência de granulomas, observou-se menor proporção de eosinófilos de E1 e maior proporção de E2. Já no IG distal, porção que apresentou menor frequência de granulomas, verificou-se maior proporção de E1 e ausência de diferença de E2 quando comparado ao controle dessa porção. Sendo E2 associada a resposta Th2 que marca o início da resposta granulomatosa, é plausível que a ausência de diferença da proporção dessa subpopulação (E2) entre animais infectados e controle no IG distal, possa estar relacionada a baixa densidade e proporção de granulomas encontrados neste seguimento quando comparado ao ID distal.

Esses achados apontam para o remodelamento geral da resposta imune eosinofílica frente à infecção aguda por *S. mansoni*. Durante a infecção, a resposta é inicialmente caracterizada pelo perfil Th1, com expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IFN- γ e as IL -1, -2 e -12 (Zheng, Zhang et al. 2020). Com o início da oviposição a partir da sexta semana, antígenos excretados pelos ovos induzem a mudança gradual de perfil de resposta para Th2, com expressão de IL-4, -5 e -13 (Zheng, Zhang et al. 2020). Essa mudança no eixo da resposta imune está associada ao aumento da eosinofilia tecidual e à formação de granulomas, fenômenos que, no presente estudo, se refletem na predominância de granulomas em estágio PE e na presença de uma população robusta de eosinófilos nesse estágio.

Em conjunto, os achados indicam que a resposta eosinofílica durante a infecção por *S. mansoni* é dinamicamente modulada pelo microambiente intestinal, apresentando variações regionais na polarização funcional dessas células. A diferença na predominância entre os perfis E1 e E2 ao longo dos segmentos intestinais associa-se à carga granulomatosa local, sugerindo que os eosinófilos não apenas participam da formação do granuloma, mas também refletem e possivelmente modulam a organização e a intensidade da resposta inflamatória de maneira espaço-dependente.

7.CONCLUSÕES

7.1. Mapeamento de granulomas no intestino

- O intestino delgado é mais acometido pela infecção por *S. mansoni* (formação de granulomas e ovos isolados).
- A maioria dos granulomas formados durante a infecção encontra-se na região submucosa, ID e IG. A submucosa é constituída de tecido conjuntivo, bastante vascularizado, o que a caracteriza como um alvo estratégico para o parasito a fim de obter sucesso na liberação dos ovos através da parede intestinal.
- Nesse trabalho foi identificado granulomas no estágio NE. Comparado ao granuloma hepático, a necrose nos granulomas intestinais ocorre majoritariamente de maneira difusa por toda a extensão do granuloma, podendo estar associada a liberação de espaço tecidual para o transporte dos ovos.
- PE é o estágio evolutivo mais frequente. Granulomas PE são marcados por seu caráter dinâmico e maleáveis, cuja principal função no contexto intestinal é carrear os ovos do parasito através da parede em direção ao lúmen do órgão.

7.2. Mapeamento de eosinófilos em granulomas intestinais

- A população de eosinófilos apresentou uma redução progressiva ao longo dos estágios evolutivos no ID, reforçando a ideia de que eosinófilos se reorganizam à medida que o granuloma evolui.
- Eosinófilos possuem um nicho ecológico em granulomas maduros intestinais na região medial- periférica, onde se estabelecem e sofrem maturação (positividade para MBP-1 e CD34+). Isso indica um papel mais complexo na organização e modulação do microambiente inflamatório.
- A presença de subpopulações de eosinófilos (E1 e E2) indica que essas células modulam a organização e a intensidade da resposta inflamatória ao longo das porções do intestino.

- A predominância de subpopulações E2 em todas as porções indicam que os eosinófilos apresentam um papel mais associado à resposta Th2, à modulação e resolução da inflamação.
- Em conjunto, o presente trabalho amplia o entendimento da dinâmica da inflamação granulomatosa intestinal durante a infecção aguda por *S. mansoni* e identifica, pela primeira vez, um nicho ecológico de eosinófilos em granulomas maduros. A compartimentalização predominante de eosinófilos fora da região periovular não favorece um papel direto destas células em relação ao parasito. Os achados avançam no entendimento das funcionalidades dos granulomas e dos eosinófilos durante a esquistossomose mansoni intestinal.

8.REFERÊNCIAS

- Ackerman, S. J. and N. I. Stacy (2024). "Considerations on the evolutionary biology and functions of eosinophils: what the “haeckel”?" **Journal of Leukocyte Biology** 116(2): 247–259.
- Álvarez, J., J. M. F. Real, F. Guarner, M. Gueimonde, J. M. Rodríguez, M. S. de Pipaon and Y. Sanz (2021). "Microbiota intestinal y salud." **Gastroenterología y Hepatología** 44(7): 519–535.
- Amaral, K. B., T. P. Silva, F. F. Dias, K. K. Malta, F. M. Rosa, S. F. Costa-Neto, R. Gentile and R. C. N. Melo (2017). "Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging." **PloS One** 12(9): e0184696.
- Arakelian, L., J. Lion, G. Churlaud, R. Bargui, B. Thierry, E. Mutabazi, P. Bruneval, A. J. Alberdi, C. Doliger and M. Veyssiere (2023). "Endothelial CD34 expression and regulation of immune cell response in-vitro." **Scientific Reports** 13(1): 13512.
- Arnold, I. C. and A. Munitz (2024). "Spatial adaptation of eosinophils and their emerging roles in homeostasis, infection and disease." **Nature Reviews Immunology** 24(12): 858–877.
- Barata, L. M., K. K. Malta, V. H. Neves, C. Palazzi, E. G. Oliveira-Barros, Y. Aguiar, F. Kneip, B. A. Marcelino, L. A. S. Carmo and J. F. Audi-Gazeta (2025). "A major ecological niche of eosinophils in evolving *Schistosoma* granulomas challenges the eosinophil view as “helminth killer” cells." **Science Advances** 11(24): eadt2779.
- Barsoum, R. S., G. Esmat and T. El-Baz (2013). "Human schistosomiasis: clinical perspective: Review." **Journal of advanced research** 4(5): 433–444.
- Bertoldi, M. C. A., P. d. S. da Silva, S. R. de Brito Bello, C. T. Pazello, R. S. M. Zarpellon, A. C. Venturelli and R. W. Silva (2024). "Imunidade intestinal mediada pelo GALT (Tecido Linfoide Associado ao Intestino) nas doenças inflamatórias intestinais." **Research, Society and Development** 13(12): e117131247647–e117131247647.
- Buonfrate, D., T. C. A. Ferrari, A. A. Adegnik, J. R. Stothard and F. G. Gobbi (2025). "Human schistosomiasis." **The Lancet** 405(10479): 658–670.
- Burke, M. L., M. K. Jones, G. N. Gobert, Y. S. Li, M. K. Ellis and D. P. McManus (2009). "Immunopathogenesis of human schistosomiasis." **Parasite Immunology** 31(4): 163–176.
- Butterworth, A. E., D. L. Wassom, G. J. Gleich, D. A. Loegering and J. R. David (1979). "Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein." **The Journal of Immunology** 122(1): 221–229.
- Capron, M. and A. Capron (1992). "Effector functions of eosinophils in schistosomiasis." **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** 87: 167–170.
- Capron, M., G. Torpier and A. Capron (1979). "In vitro killing of *S. mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: role of cytophilic antibodies." **The Journal of Immunology** 123(5): 2220–2230.

Carmo, L. A., K. Bonjour, L. A. Spencer, P. F. Weller and R. C. N Melo (2018). "Single-cell analyses of human eosinophils at high resolution to understand compartmentalization and vesicular trafficking of interferon-gamma." **Frontiers in immunology** 9: 1542.

Cheng, Y., Z. Ling and L. Li (2020). "The intestinal microbiota and colorectal cancer." **Frontiers in immunology** 11: 615056.

Chu, V. T., A. Beller, S. Rausch, J. Strandmark, M. Zänker, O. Arbach, A. Kruglov and C. Berek (2014). "Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis." **Immunity** 40(4): 582–593.

Chuah, C., M. K. Jones, M. L. Burke, D. P. McManus and G. N. Gobert (2014). "Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology." **Trends in Parasitology** 30(3): 141–150.

Colley, D. G., A. L. Bustinduy, W. E. Secor and C. H. King (2014). "Human schistosomiasis." **The Lancet** 383(9936): 2253–2264.

de Oliveira, V. G., V. F. Rodrigues, J. M. P. Moreira, J. L. Rodrigues, L. Maggi, S. D.

Resende and D. Negrão-Corrêa (2022). "Eosinophils participate in modulation of liver immune response and tissue damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice." **Cytokine** 149(155701): 155701.

Dias, F. F., K. B. Amaral, K. K. Malta, T. P. Silva, G. S. C. Rodrigues, F. M. Rosa, G. O. L. Rodrigues, V. V. Costa, H. Chiarini-Garcia, P. F. Weller and R. C. N. Melo (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.

Dolitzky, A., I. Hazut, S. Avlas, S. Grisaru-Tal, M. Itan, I. Zaffran, F. Levi-Schaffer, M. Gerlic and A. Munitz (2022). "Differential regulation of Type 1 and Type 2 mouse eosinophil activation by apoptotic cells." **Frontiers in Immunology** Volume 13 - 2022.

Dolitzky, A., G. Shapira, S. Grisaru-Tal, I. Hazut, S. Avlas, Y. Gordon, M. Itan, N. Shomron and A. Munitz (2021). "Transcriptional Profiling of Mouse Eosinophils Identifies Distinct Gene Signatures Following Cellular Activation." **Frontiers in Immunology** Volume 12 - 2021.

Elbaz, T. and G. Esmat (2013). "Hepatic and intestinal schistosomiasis: review." **Journal of advanced research** 4(5): 445–452.

Fairfax, K., M. Nascimento, S. C.-C. Huang, B. Everts and E. J. Pearce (2012). **Th2 responses in schistosomiasis**. Seminars in immunopathology, Springer.

Francisco, J. S., M. A. B. L. Terra, G. C. T. Klein, B. C. E. P. Dias de Oliveira and M. Pelajo-Machado (2022). "The hepatic extramedullary hematopoiesis during experimental murine *Schistosomiasis mansoni*." **Frontiers in Immunology** 13: 955034.

Grimaud, J. A., D. L. Boros, C. Takiya, R. C. Mathew and H. Emonard (1987). "Collagen isotypes, laminin, and fibronectin in granulomas of the liver and intestines of *Schistosoma mansoni*-infected mice." **The American journal of tropical medicinehygiene** 37(2): 335–344.

Gryseels, B., K. Polman, J. Clerinx and L. Kestens (2006). "Human schistosomiasis." **The Lancet** 368(9541): 1106–1118.

Hams, E., G. Aviello and P. G. Fallon (2013). "The schistosoma granuloma: friend or foe?" **Frontiers in Immunology** 4: 89.

Henderson, V. (1928). "The mechanism of intestinal peristalsis." **American Journal of Physiology-Legacy Content** 86(1): 82–98.

Ignacio, A., K. Shah, J. Bernier-Latmani, Y. Köller, G. Coakley, M. Moyat, R. Hamelin, F. Armand, N. C. Wong and H. Ramay (2022). "Small intestinal resident eosinophils maintain gut homeostasis following microbial colonization." **Immunity** 55(7): 1250–1267. e1212.

Larsen, L. D., K. Dockstader, C. L. Olbrich, I. M. Cartwright and L. A. Spencer (2022). "Modulation of surface CD11c expression tracks plasticity in murine intestinal tissue eosinophils." **Journal of leukocyte biology** 111(5): 943–952.

Lenzi, H. L., E. Kimmel, H. Schechtman, M. Pelajo-Machado, W. S. Romanha, R. G. Pacheco, M. Mariano and J. A. Lenzi (1998). "Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches." **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 93(1): 141–151.

Llanwarne, F. and H. Helmbj (2021). "Granuloma formation and tissue pathology in *Schistosoma japonicum* versus *Schistosoma mansoni* infections." **Parasite immunology** 43(2): e12778.

Lundy, S. K. and N. W. Lukacs (2013). "Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression." **Frontiers in immunology** 4: 39.

Malta, K. K., C. Palazzi, V. H. Neves, Y. Aguiar, T. P. Silva and R. C. N. Melo (2022). "Schistosomiasis Mansoni-Recruited Eosinophils: An Overview in the Granuloma Context." **Microorganisms** 10(10): 1–18.

Malta, K. K., T. P. Silva, C. Palazzi, V. H. Neves, L. A. S. Carmo, S. J. Cardoso and R. C. N. Melo (2021). "Changing our view of the *Schistosoma* granuloma to an ecological standpoint." **Biological Reviews**.

McManus, D. P., R. Bergquist, P. Cai, S. Ranasinghe, B. M. Tebeje and H. You (2020). Schistosomiasis—from immunopathology to vaccines. **Seminars in immunopathology, Springer**.

Melo, R. C. N and T. P. Silva (2024). "Eosinophil activation during immune responses: an ultrastructural view with an emphasis on viral diseases." **Journal of Leukocyte Biology** 116(2): 321–334.

Melo, R. C. N, L. A. Spencer, A. M. Dvorak and P. F. Weller (2008). "Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins." **Journal of Leukocyte Biology** 83(2): 229–236.

Melo, R. C. N and P. F. Weller (2018). "Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils." **Journal of leukocyte biology** 104(1): 85–93.

Melo, R. C. N., A. M. Dvorak and P. F. Weller (2010). "Contributions of electron microscopy to understand secretion of immune mediators by human eosinophils." **Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada** 16(6): 653.

Melo, R. C. N., A. M. Dvorak and P. F. Weller (2022). Eosinophil-associated diseases (EADs). **Journal: Eosinophil Ultrastructure**: 289–394.

Melo, R. C. N., A. M. Dvorak and P. F. Weller (2022). **Eosinophil Ultrastructure: Atlas of Eosinophil Cell Biology and Pathology**, Academic Press.

Melo, R. C. N., L. Liu, J. J. Xenakis and L. A. Spencer (2013). "Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion." **Allergy** 68(3): 274–284.

Melo, R. C. N., M. W. D. Raas, C. Palazzi, V. H. Neves, K. K. Malta and T. P. Silva (2020). "Whole Slide Imaging and Its Applications to Histopathological Studies of Liver Disorders." **Frontiers in Medicine** 6: 310.

Melo, R. C. N. and P. F. Weller (2018). "Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils." **Journal of leukocyte biology** 104(1): 85–93.

Moore, D. and J. Sandgeound (1956). "The Relative Egg producing Capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*."

Moore, D. L., D. I. Grove and K. S. Warren (1977). "The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations." **Journal of Pathology** 121(1): 41–50.

Mörbe, U. M., P. B. Jørgensen, T. M. Fenton, N. von Burg, L. B. Riis, J. Spencer and W. W. Agace (2021). "Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function." **Mucosal immunology** 14(4): 793–802.

Nasciutti, L. E., M. S. Narciso, A. d. Lima, G. d. C. Brito and R. B. Oriá (2016). "Histologia do tubo digestório." **Sistema digestório: Integração básico-clínica**: 273–314.

Pecha, B., S. Martinez, L. J. Milburn, O. L. Rojas and M. A. Koch (2024). "Identification of intestinal lamina propria plasma cells by surface transmembrane activator and CAML interactor expression." **The Journal of Immunology** 212(6): 1022–1028.

Rådinger, M., A. Bossios, M. Sjöstrand, Y. Lu, C. Malmhäll, A. K. Dahlborn, J. J. Lee and J. Lötvald (2011). "Local proliferation and mobilization of CCR3+ CD34+ eosinophil-lineage-committed cells in the lung." **Immunology** 132(1): 144–154.

Schwartz, C. and P. G. Fallon (2018). "*Schistosoma* "Eggs-Itting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion." **Front Immunol** 9: 2492.

Sergejeva, S., A.-K. Johansson, C. Malmhäll and J. Lötvall (2004). "Allergen exposure–induced differences in CD34+ cell phenotype: relationship to eosinophilopoietic responses in different compartments." **Blood** 103(4): 1270–1277.

Silva, L. M. d. (1998). "Modulação do granuloma periovular esquistossomótico: morfometria e comportamento da matriz extracelular."

SINAN, S. d. I. d. A. d. N.-. (2023, 18/03/2025). "Esquistossome ", from <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/cnie/painel-esquistossomose>.

SISPCE, S. d. I. d. P. d. V. e. C. d. E.-. (2023). "Esquistossomose." from <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/cnie/painel-esquistossomose>.

Spencer, L. A., K. Bonjour, R. C. Melo and P. F. Weller (2014). "Eosinophil secretion of granule-derived cytokines." **Frontiers in immunology** 5: 496.

SVSA, S. d. V. e. S. e. A.-. (2024). Vigilância da Esquistossomose mansoni - Diretrizes técnicas. D. d. D. Transmissíveis.

Takaki, K. K., G. Rinaldi, M. Berriman, A. J. Pagán and L. Ramakrishnan (2021). "Schistosoma mansoni eggs modulate the timing of granuloma formation to promote transmission." **Cell Host Microbe** 29(1): 58–67. e55.

Torsello, A., C. Cattani, C. Napoli, A. Cavani and F. Scopelliti (2026). "From cercariae to chronic inflammation: understanding schistosome infection and host immune responses." **Frontiers in Immunology** 16: 1729394.

Vieira, B. M., B. F. Almeida and M. P. Machado (2025). "Eosinophil and B-cell dynamics in the milky spots from Schistosoma mansoni-infected mice: comparison with spleen and bone marrow, and extramedullary eosinopoiesis." **Int Immunol** 37(3): 173–185.

Weerakoon, K. G., G. N. Gobert, P. Cai and D. P. McManus (2015). "Advances in the diagnosis of human schistosomiasis." **Clinical microbiology reviews** 28(4): 939–967.

Weinstock, J. V. and D. L. Boros (1983). "Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with Schistosomiasis mansoni." **The Journal of Immunology** 130(1): 418–422.

Weller, P. F. and L. A. Spencer (2017). "Functions of tissue-resident eosinophils." **Nature Reviews Immunology** 17(12): 746–760.

WHO, W. H. O.-. (2023). "Schistosomiasis."

Wynn, T. A., R. W. Thompson, A. W. Cheever and M. M. Mentink-Kane (2004). "Immunopathogenesis of schistosomiasis." **Immunological reviews** 201(1): 156–167.

Xenakis, J. J., E. D. Howard, K. M. Smith, C. L. Olbrich, Y. Huang, D. Anketell, S. Maldonado, E. W. Cornwell and L. A. Spencer (2018). "Resident intestinal eosinophils constitutively express antigen presentation markers and include two phenotypically distinct subsets of eosinophils." **Immunology** 154(2): 298–308.

Zheng, B., J. Zhang, H. Chen, H. Nie, H. Miller, Q. Gong and C. Liu (2020). "T Lymphocyte-Mediated Liver Immunopathology of Schistosomiasis." **Frontiers in Immunology** 11: 61.