

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

Luccas Miranda Barata

**DINÂMICA ESPAÇO-TEMPORAL DE EOSINÓFILOS EM GRANULOMAS
INDUZIDOS PELA INFECÇÃO NATURAL E EXPERIMENTAL POR *Schistosoma
mansoni*: uma abordagem histopatológica, imunohistoquímica e tridimensional**

Belo Horizonte
2024

Luccas Miranda Barata

**DINÂMICA ESPAÇO-TEMPORAL DE EOSINÓFILOS EM GRANULOMAS
INDUZIDOS PELA INFECÇÃO NATURAL E EXPERIMENTAL POR *Schistosoma
mansoni*: uma abordagem histopatológica, imunohistoquímica e tridimensional**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Rossana Correa Netto de Melo

Belo Horizonte

2024

043

Barata, Luccas Miranda.

Dinâmica espaço-temporal de eosinófilos em granulomas induzidos pela infecção natural e experimental por *Schistosoma mansoni*: uma abordagem histopatológica, imunohistoquímica e tridimensional [manuscrito] / Luccas Miranda Barata. – 2024.

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

Orientadora: Dra. Rossana Correa Netto de Melo.

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

1. Biologia Celular. 2. Eosinófilos. 3. Esquistossomose. 4. Granuloma. 5. Fígado. I. Melo, Rossana Correa Netto de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576

Processo:

Documento:

23072.205385/2024-37

3515658



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

ATA DE DEFESA DE TESE**LUCCAS MIRANDA BARATA**

Às quatorze horas do dia 29 de agosto de 2024, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**DINÂMICA ESPAÇO-TEMPORAL DE EOSINÓFILOS EM GRANULOMAS INDUZIDOS PELA INFECÇÃO NATURAL E EXPERIMENTAL POR SCHISTOSOMA MANSONI: UMA ABORDAGEM HISTOPATOLÓGICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E TRIDIMENSIONAL**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. A banca foi composta pelos Professores: Dr. Bruno Marques Vieira - Fiocruz - RJ, Dra. Florence Mara Rosa - UFJF, Dra. Claudia Rocha Carvalho - UFMG, Dra. Valdirene de Souza Muniz - UFRJ. 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 ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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.

Dr. Rossana Correa Netto de Melo (Orientadora) _____

Dr. Bruno Marques Vieira _____

Dra. Florence Mara Rosa _____

Dra. Claudia Rocha Carvalho _____

Dra. Valdirene de Souza Muniz _____

Belo Horizonte, 29 de agosto de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Rocha Carvalho, Professora do Magistério Superior**, em 03/09/2024, às 10:56, 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 **Bruno Marques Vieira, Usuário Externo**, em 03/09/2024, às 11:43, 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 **Valdirene de Souza Muniz, Usuária Externa**, em 04/09/2024, às 10:14, 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 **Florence Mara Rosa, Usuária Externa**, em 05/09/2024, às 09:52, 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 04/10/2024, às 09:26, 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?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3515658** e o código CRC **AEEF55BA**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por tudo o que tens me proporcionado. Independente de todas as dificuldades, até aqui tens me sustentado.

Aos meus pais Amilton e Concy e demais membros da minha família por todo amor, carinho e suporte em todas as fases da minha vida. Todas as palavras de motivação e apoio foram essenciais para que eu continuasse a seguir meus sonhos e nos momentos mais difíceis vocês foram meu porto seguro. Amo muito vocês e saibam que essa conquista também é de vocês.

A Prof. Dra. Rossana Melo por aceitar o desafio de me orientar mesmo com todas as dificuldades impostas pelas situações que passei durante este doutorado. Em um momento em que achei que não conseguiria continuar, você me mostrou que há sempre uma luz no fim do túnel. Muito obrigado pela confiança, paciência e incentivo em desenvolver este trabalho e por auxiliar no meu crescimento profissional e, até mesmo, pessoal.

A CAPES pela bolsa concedida, ao CNPq, FAPEMIG e a Harvard-Lemann Research Fund pelo fomento ao presente projeto.

Aos professores membros da banca examinadora pelas contribuições para a melhoria deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Celular da UFJF: Kássia, Thiago, Vitor, Cinthia, Eliane, Eliana, Yasmin e Felipe, que estiveram diretamente envolvidos na execução deste trabalho. Obrigado pelo acolhimento desde quando cheguei em Juiz de Fora, além dos momentos de alegria e descontração e por toda ajuda nos experimentos e análises dos resultados, principalmente na reconstrução 3D que não foi nada fácil de fazer.

Deixo aqui um agradecimento especial ao Vitor Neves que, junto a Prof. Rossana, desenvolveu a metodologia de reconstrução 3D dos granulomas, pois não foi uma tarefa fácil ter que escanear mais de 1000 lâminas, alinhar mais de 500 imagens no Photoshop e depois criar os vídeos com as etapas da reconstrução para cada granuloma. Toda dedicação e paciência valeram a pena e conseguimos ótimos resultados para este projeto. Muito obrigado por toda ajuda!

Agradeço também especialmente a Kássia Malta, que me auxiliou em todos os momentos desde que cheguei a esta equipe. Desde as primeiras análises histológicas, reconstrução 3D, imunohistoquímicas, ultraestruturas dos eosinófilos e muito mais. Eu não teria chegado até aqui sem sua ajuda e por tudo isso sou extremamente grato. Obrigado pelos conselhos e mentoria que me ajudaram muito a me dedicar ao projeto e chegar até o final desse capítulo da minha vida. E se hoje tenho um profundo conhecimento sobre esta linha de pesquisa, você foi uma das principais responsáveis por me ensinar tudo o que sei. Saiba que tenho uma profunda admiração e carinho por você e lhe considero uma pessoa e pesquisadora incrível!

A todos os membros colaboradores deste projeto, dos laboratórios da UFMG, UEMG, UFRJ e FIOCRUZ-RJ.

A todos os meus amigos queridos que fiz ao longo deste doutorado e me acompanharam em todo este processo. Desde os amigos que fiz no dia-a-dia do laboratório, nos rolês fora da UFMG, ou jogando vôlei por aí, seja em Belo Horizonte ou em Juiz de Fora, todos os momentos

de descontração ficarão marcados em minha memória e meu coração. Obrigado por todo carinho e apoio, principalmente nos momentos que mais estive vulnerável e queria desistir. Todas as palavras de motivação e incentivo me ajudaram de alguma forma para seguir em frente e terminar este doutorado.

Falando em vôlei, deixo um agradecimento especial ao time de vôlei de Biologia da UFMG, o qual orgulhosamente fiz parte desde abril de 2022 e com muita honra tenho sido o capitão do time nos torneios que disputamos. Obrigado por todos os momentos que compartilhamos dentro e fora de quadra. Seja nas vitórias, ou nas derrotas. Vocês foram uma grande família na qual tive muito orgulho de fazer parte nesses 2 últimos anos. E torço pra que esse grupo continue crescendo e conquistando mais e mais vitórias. E como sempre: 1, 2, 3, BIIIIII!!!!

Aos meus amigos de Belém do Pará que estou sempre morrendo de saudades, pois só consigo ver vocês uma vez por ano: Vinicius, Carol, Vanessa, Amanda, Lucas, Henrique, Izabel, Rimas, Raday e muitos outros amigos queridos. Vocês também são meu porto seguro. Nos momentos que eu mais queria desistir, vocês me deram força e incentivo pra continuar essa caminhada.

Aos amigos queridos que fiz em Juiz de Fora nesse período de reviravolta na minha vida, principalmente meu grupinho de fofocas: Vitória, Douglas e Letícia. Vocês em tão pouco tempo tiveram um tremendo impacto na minha vida. Nesse último ano que morei em JF, vocês me acolheram da melhor forma possível e só tenho a agradecer por todos os momentos maravilhosos que compartilhamos desde que nos conhecemos.

Por fim, deixo aqui registrado um agradecimento especial ao meu grande amigo Wylerson Nogueira, que foi quem mais me deu suporte emocional, principalmente quando atingi meu ponto mais baixo durante este doutorado e achei que não conseguiria continuar. Todas as palavras de apoio e motivação e os conselhos que me destes foram essenciais para que eu não desistisse e tivesse forças para lidar com todos os problemas que me foram impostos. Se hoje estou defendendo esta tese, é porque você teve um grande impacto nas horas que mais precisei. Obrigado pela amizade de mais de 10 anos e por todos os momentos que tivemos juntos!

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta a este trabalho.

Quando nós atingimos o ponto mais baixo,
estamos abertos para maior mudança!

Avatar Aang

RESUMO

Eosinófilos têm sido historicamente associados à proteção do hospedeiro contra helmintos como o *Schistosoma mansoni* – o agente causador da esquistossomose –, uma doença tropical negligenciada. Estas células se acumulam massivamente em granulomas, principalmente no fígado, sendo a principal característica histopatológica desta infecção. Como os eosinófilos impactam a vida do granuloma permanece desconhecido. Um grande desafio na compreensão do papel dos eosinófilos nessa infecção é a natureza dinâmica e complexa dos granulomas. Neste trabalho, eosinófilos foram mapeados ao longo dos estágios evolutivos de granulomas hepáticos durante a infecção experimental (camundongos *Swiss*) e natural (reservatório silvestre *Nectomys squamipes*) por *S. mansoni*. Fragmentos de fígado de ambos os modelos foram processados para análises histopatológicas por *Whole Slide Imaging* (WSI). Os seguintes parâmetros dos granulomas foram avaliados: (i) identificação e distribuição; (ii) área; (iii) delimitação das zonas espaciais; (iv) quantificação de eosinófilos e outras células; (v) imunomarcção para MBP-1. Eosinófilos foram avaliados qualitativamente e quantitativamente por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A reconstrução tridimensional (3D) de granulomas inteiros em cada estágio evolutivo também foi realizada. Com isso, foi descoberto que os granulomas são um sistema evolutivo com uma natureza dinâmica devido às mudanças graduais em sua microarquitetura. Em granulomas de ambas as infecções experimental e natural, os eosinófilos estão espacialmente organizados e ocupam um importante nicho ecológico periférico conservado ao longo de sua evolução espaço-temporal. A imunomarcção de MBP-1 em granulomas do modelo experimental confirmou a localização espacial preferencial de eosinófilos. Análises ultraestruturais mostraram a interação robusta de eosinófilos maduros e imaturos com outras células imunes neste nicho e identificou que estas células finalizam sua maturação nos granulomas e desgranulam principalmente por *piecemeal*. Esta compartimentalização espacial, não associada aos ovos do parasito, desafia o conceito de eosinófilos atuando como células “matadoras de helmintos” e reforçam sua visão como uma célula imunorreguladora na esquistossomose. A descoberta do nicho ecológico de eosinófilos na periferia de granulomas contribui para melhor entendimento da complexidade biológica da interação eosinófilos-parasito-microambiente durante infecções helmínticas.

Palavras-chave: eosinófilos; esquistossomose; granulomas; fígado; infecção experimental; infecção natural; histopatologia; microscopia eletrônica; reservatório silvestre; nicho ecológico.

ABSTRACT

Eosinophils have historically been credited with host protection against helminths such as *Schistosoma mansoni* – the causal agent of schistosomiasis –, a neglected tropical disease. These cells massively accumulate within granulomas, mainly in the liver, the pathological hallmark of *Schistosoma* infection. The way in which eosinophils impact the granuloma life remains controversial. A big hurdle in understanding the eosinophil role in schistosomiasis is the complex and dynamic granuloma nature. In this work, eosinophils were mapped across evolutionary hepatic granulomas during experimental (*Swiss mice*) and natural (wild reservoir *Nectomys squamipes*) *S. mansoni* infection. Liver fragments from both models were prepared for histopathological analysis of *Whole Slide Imaging* (WSI). The following parameters of the granulomas were evaluated: (i) identification and distribution; (ii) area; (iii) delimitation of spatial zones; (iv) quantification of eosinophils and other cells; (v) immunostaining for MBP-1. Eosinophils were also qualitatively and quantitatively evaluated by transmission electron microscopy (TEM). A three-dimensional (3D) reconstruction of entire granulomas across all evolutionary stages was also performed. Thus, we discovered that granulomas are an evolutionary system with a dynamic nature due to gradual changes in their microarchitecture. In granulomas from both experimental and natural infections, eosinophils are spatially organized and occupy an important peripheral ecological niche conserved throughout space and time. MBP-1 immunostaining in granulomas from the experimental model confirms the preferential spatial localization of eosinophils. Ultrastructural analyses displayed a robust interaction of mature and immature eosinophils with other immune cells in this niche and identified that these cells complete their maturation within granulomas and degranulate by piecemeal. This spatial compartmentalization, not associated with parasite eggs, challenges the concept of eosinophils as a “helminth killer” cell and invigorates their view as an immunoregulatory cell in schistosomiasis. The discovery of the ecological niche of eosinophils within the granuloma periphery contributes to a better understanding of the biological complexity of eosinophil-parasite-microenvironment interaction during helminth infections.

Keywords: eosinophil; schistosomiasis; granulomas; liver; experimental infection; natural infection; histopathology; electron microscopy; wild reservoir; ecological niche.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mapa da prevalência da esquistossomose no mundo.....	20
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	21
Figura 3. Conchas de (A) <i>Biomphalaria glabrata</i> , (B) <i>Biomphalaria teganophila</i> , e (C) <i>Biomphalaria straminea</i> , hospedeiros intermediários do parasito <i>S. mansoni</i>	23
Figura 4. O reservatório silvestre <i>Nectomys squamipes</i> , popularmente conhecido como rato d'água.	25
Figura 5. Imagem representativa de um granuloma do fígado de um camundongo infectado por <i>S. mansoni</i> corado com Fast Green-Neutral Red.	27
Figura 6. Representação da microarquitetura de granulomas esquistossomóticos em seus diferentes estágios de desenvolvimento.	28
Figura 7. Mediadores derivados de eosinófilos e suas funções.....	30
Figura 8. Características ultraestruturais de um eosinófilo maduro humano.	31
Figura 9. Mudanças morfológicas observadas na ultraestrutura de eosinófilos durante seu processo de ativação em respostas imunes.	33
Figura 10. Processos de secreção de eosinófilos após estímulos externos, liberando seu conteúdo para o meio extracelular.....	34
Figura 11. Distribuição e características histopatológicas da evolução de granulomas esquistossomóticos hepáticos.	49
Figura 12. Delimitação digital das zonas espaciais de granulomas.....	50
Figura 13. O granuloma esquistossomótico é um sistema evolutivo dinâmico.	55
Figura 14. Eosinófilos infiltrantes estão espacialmente organizados e ocupam um sítio preferencial dentro de granulomas.	58
Figura 15. A marcação de MBP-1 é altamente concentrada na zona periférica dos granulomas esquistossomóticos hepáticos.	61
Figura 16. Eosinófilos estabelecem interação direta com outras células imunes na periferia dos granulomas esquistossomóticos.	63
Figura 17. Eosinófilos secretam por desgranulação por piecemeal (PMD) em granulomas esquistossomóticos.	65
Figura 18. Eosinófilos apresentam adaptação espacial em granulomas formados durante a infecção natural por <i>S. mansoni</i>	68
Figura 19. Reconstruções tridimensionais (3D) destacam o nicho de eosinófilos dentro de granulomas esquistossomóticos.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados histopatológicos de camundongos na infecção experimental aguda e crônica por <i>Schistosoma mansoni</i>	91
Tabela 2. Dados histopatológicos de <i>Nectomys squamipes</i> na infecção natural por <i>Schistosoma mansoni</i>	92
Tabela 3. Dados quantitativos de granulomas reconstruídos em 3D.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D – Bidimensional

3D – Tridimensional

CD (*Cluster Differentiation*) 4+, 8+ – molécula de superfície

CEBIO – Centro de Bioterismo

DAB – Diaminobenzidina

DTN – Doença tropical negligenciada

EAD (*Eosinophil Associated Diseases*) – Doenças Associadas a Eosinófilos

ECP (*Eosinophil Cationic Protein*) – Proteína Catiônica Eosinofílica

EDN (*Eosinophil-Derived Neurotoxin*) – Neurotoxina Derivada do Eosinófilo

EoSvs (*Eosinophil Sombrero Vesicles*) – Vesículas do Tipo Sombrero (Vesículas Sombreros)

EP – Exudativo-produtivo

EPX/EPO (*Eosinophil Peroxidase*) – Peroxidase Eosinofílica

FEG (*Free Extracellular Granules*) – Grânulos Extracelulares Livres

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

Gal-10 – Galectina-10

GMA – Glicolmetacrilato

HE – Hematoxilina-Eosina

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

Ig (IgG, IgG2a) – Imunoglobulina

IHQ – Imunohistoquímica

IL (-1, -2, -4, -5, -10, -12, -13) – Interleucinas

INF-g – Interferon-gama

MBP (*Major Basic Protein*) – Proteína Básica Principal

MEC – Matriz Extracelular

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

NE – Necrótico-exudativo

OMS – Organização Mundial da Saúde

P – Produtivo

PBS – Solução Salina Fosfato Tamponada

PE – Pré-granulomatoso-exudativo

PMD (*Piecemeal Degranulation*) – Desgranulação por Piecemeal

PRR (*Pattern Recognition Receptor*) – Receptor de Reconhecimento Padrão

RE – Retículo Endoplasmático

SEA (*Soluble Egg Antigens*) – Antígenos Solúveis de Ovos

Th (*T helper*) 1 e 2 – Linfócitos T auxiliares 1 e 2

TNF-a (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) – Fator de Necrose Tumoral-Alfa

TLR – Receptor *Toll-like*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VE – Vesícula Extracelular

WSI (*Whole Slide Imaging*) – Técnica de Escaneamento de Lâminas Inteiras

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1. Aspectos gerais da esquistossomose	19
3.1.1. Dados epidemiológicos	19
3.2. Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	20
3.2.1. Fase assexuada	21
3.2.2. Fase sexuada.....	22
3.3. Hospedeiros da infecção por <i>S. mansoni</i>	22
3.3.1. Hospedeiros intermediários	22
3.3.2. Hospedeiros vertebrados.....	24
3.3.2.1. Reservatórios silvestres (<i>Nectomys squamipes</i>).....	24
3.4. Resposta imune do hospedeiro vertebrado	26
3.4.1. Immunopatogênese	26
3.4.2. Resposta inflamatória granulomatosa	27
3.4.3. Arquitetura do granuloma.....	28
3.5. Eosinófilos.....	29
3.5.1. Aspectos gerais.....	29
3.5.2. Maturação e ativação de eosinófilos.....	32
3.5.3. Processos de secreção de eosinófilos.....	33
3.5.3.1. Exocitose	34
3.5.3.2. Desgranulação por piecemeal (PMD)	35
3.5.3.3. Citólise	36
3.5.4. Eosinófilos no contexto da infecção por <i>S. mansoni</i>	36
4. JUSTIFICATIVA	38
5. MATERIAL E MÉTODOS	39

5.1.	Modelo de infecção experimental por <i>S. mansoni</i>	39
5.1.1.	Animais, infecção e comitê de ética	39
5.1.2.	Eutanásia e obtenção do órgão para experimentação	40
5.2.	Modelo de infecção natural por <i>S. mansoni</i>	40
5.2.1.	Área de estudo, captura e comitê de ética	40
5.2.2.	Eutanásia e obtenção do órgão para experimentação	41
5.3.	Processamento das amostras para análises histológicas	41
5.3.1.	Inclusão em resina glicolmetacrilato (GMA)	41
5.3.2.	Inclusão em parafina (Paraplast Plus®).....	42
5.3.3.	Microtomia e coloração	42
5.3.3.1.	Coloração em Hematoxilina-Eosina (HE)	43
5.3.3.2.	Coloração em Fast Green-Neutral Red	43
5.3.3.3.	Coloração em Tricrômico de Gomori.....	44
5.4.	Imunohistoquímica (IHQ) para MBP-1	44
5.5.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	46
5.5.1.	Processamento das amostras	46
5.5.2.	Microtomia, coloração e leitura das micrografias eletrônicas	47
5.6.	Análises de imagem	47
5.6.1.	Whole Slide Imaging (WSI).....	47
5.6.2.	Enumeração e classificação dos granulomas.....	47
5.6.3.	Quantificação e distribuição de eosinófilos em granulomas.....	49
5.6.4.	Análise quantitativa de IHQ.....	51
5.6.5.	Análise qualitativa e quantitativa de MET	51
5.6.6.	Reconstrução tridimensional (3D) de secções seriadas de granulomas hepáticos	51
5.7.	Análises estatísticas.....	52
6.	RESULTADOS	53
6.1.	O granuloma esquistossomótico é um sistema evolutivo dinâmico.....	53
6.2.	Eosinófilos são organizados espacialmente e ocupam um sítio preferencial dentro de granulomas esquistossomóticos.....	56

6.3. Eosinófilos estabelecem interação direta com outras células imunes na zona periférica de granulomas esquistossomóticos	62
6.4. A localização espacial de eosinófilos em granulomas esquistossomóticos é conservado na infecção natural	66
6.5. Eosinófilos ocupam um importante nicho ecológico em granulomas esquistossomóticos	69
7. DISCUSSÃO	73
8. CONCLUSÕES.....	78
9. REFERÊNCIAS.....	79
10. ANEXOS.....	91

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada (DTN) de grande importância clínica e socioeconômica causada pelos vermes trematódeos do gênero *Schistosoma* (PIROVICH; DA'DARA; SKELLY, 2022). Dados globais mostram que a transmissão desta doença ocorre em 78 países, com mais de 200 milhões de pessoas afetadas, e mais de 200 mil mortes ocorrendo anualmente (COLLEY et al., 2014; SKELLY; DA'DARA, 2023).

Dentre as espécies do gênero, existem três principais que causam a doença em humanos: *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*, com ocorrência no Brasil apenas da espécie *S. mansoni* (AMARAL et al., 2017; MCMANUS et al., 2018). Atualmente, estima-se que mais de 1,5 milhão de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão do parasito no Brasil e mais de 423 mil casos foram registrados entre os anos de 2009 e 2019 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2021).

Apesar da extensa pesquisa em esquistossomose e dos grandes avanços científicos, ainda há muito a se aprender sobre a doença, especificamente no que diz respeito ao melhor tratamento e desenvolvimento de vacinas (HOTEZ, 2017). Desde 1970, o praziquantel, apesar da eficácia incompleta e da possibilidade de resistência ao fármaco, tem sido a quimioterapia de escolha no tratamento da esquistossomose e, até o momento, ainda não há vacina eficaz disponível contra esta doença (MALTA et al., 2021).

A principal característica da esquistossomose mansônica é a resposta inflamatória granulomatosa desenvolvida em torno dos ovos do parasito, principalmente no fígado e no intestino (LLANWARNE; HELMBY, 2021). Os granulomas esquistossomóticos são estruturas esféricas, bem organizadas e dinâmicas, formadas pelo ovo do parasito e por grupos de células inflamatórias e residentes que interagem entre si e com os componentes de uma matriz extracelular heterogênea (MALTA et al., 2021, 2022).

Os granulomas possuem, como função principal, a proteção do tecido hepático, isolando as toxinas secretadas pelos ovos (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018; TAKAKI et al., 2021). No entanto, o papel dos granulomas ainda é bastante discutido e considerado paradoxal, ou seja, enquanto atuam como uma barreira física entre o ovo e o tecido circundante para minimizar o dano causado pelos ovos, também constituem a causa da patologia em indivíduos infectados com subsequente formação de fibrose (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013).

Durante sua formação, os granulomas esquistossomóticos passam por mudanças morfológicas em sua composição celular e na matriz extracelular. Nosso grupo de pesquisa vem investigando essa composição, com foco no estudo dos eosinófilos, células que se acumulam

acentuadamente na esquistossomose mansônica (AMARAL *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2018; MALTA *et al.*, 2021, 2022). Classicamente, a função de eosinófilos está associada com a proteção do hospedeiro a partir da capacidade dessas células de desgranular, ou seja, liberar proteínas tóxicas provenientes de seus grânulos de secreção (WELLER; SPENCER, 2017). No entanto, o papel dos eosinófilos na esquistossomose mansônica ainda é pouco entendido. Permanece obscuro se estas células atuam como células efectoras contra o parasito; moduladores da resposta imune; participantes do metabolismo tecidual ou meramente operadores na remodelagem e eliminação de restos celulares após dano tecidual (MALTA *et al.*, 2022).

Para gerar conhecimento quanto ao papel dos eosinófilos, é importante entender a biologia dos eosinófilos no microambiente dos granulomas induzidos pela infecção por *S. mansoni*. Aspectos como a migração/distribuição de eosinófilos e suas interações dentro de granulomas permanecem pouco entendidos, especialmente devido ao desafio imposto pela complexidade desses granulomas.

No presente trabalho, estudamos em detalhes, a partir da aplicação de técnicas histopatológicas e reconstruções tridimensionais, a localização espacial de eosinófilos em granulomas formados no fígado durante a esquistossomose mansônica usando dois modelos de infecção: experimental (camundongos *Swiss*) e natural (reservatório silvestre *Nectomys squamipes*).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Investigar a dinâmica espaço-temporal de eosinófilos em granulomas hepáticos durante a infecção experimental e natural por *Schistosoma mansoni*.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o processo de formação de granulomas na infecção aguda e crônica experimental (camundongos *Swiss*) por *S. mansoni*;
- Investigar o recrutamento e distribuição espacial de eosinófilos nos diferentes estágios evolutivos de granulomas na infecção aguda e crônica experimental por *S. mansoni*;
- Investigar os aspectos ultraestruturais de eosinófilos em granulomas no modelo experimental de infecção por *S. mansoni*;
- Avaliar a distribuição espacial da Proteína Básica Principal (MBP)-1 nos estágios evolutivos de granulomas na infecção aguda e crônica experimental por *S. mansoni*;
- Investigar o recrutamento e distribuição espacial de eosinófilos nos diferentes estágios evolutivos de granulomas na infecção natural (reservatório silvestre *N. squamipes*) por *S. mansoni*;
- Elaborar reconstruções tridimensionais (3D) dos diferentes estágios evolutivos do granuloma, em modelo experimental e natural da infecção;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Aspectos gerais da esquistossomose

A esquistossomose é uma DTN de grande importância clínica e socioeconômica causada pelos vermes trematódeos do gênero *Schistosoma* (PIROVICH; DA'DARA; SKELLY, 2022). A doença é geralmente endêmica em comunidades rurais de baixa renda, com acesso limitado a água potável, condições de saneamento inadequados e sem acesso a postos de saúde com estrutura para atender a demanda (AULA *et al.*, 2021).

Dentre as espécies do gênero, existem três principais que causam a doença em humanos: *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*, com ocorrência no Brasil apenas da espécie *S. mansoni* (AMARAL *et al.*, 2017; MCMANUS *et al.*, 2018). A espécie foi introduzida no país durante o período da escravidão, onde a partir do tráfico de escravos africanos infectados, o parasito encontrou um ambiente propício para seu desenvolvimento, devido a presença de um hospedeiro intermediário suscetível (moluscos do gênero *Biomphalaria*) (KATZ; ALMEIDA, 2003; SOUZA *et al.*, 2011).

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) renovou os esforços na luta contra DTNs a partir das diretrizes para DNTs 2021-2030 para alcançar os objetivos de desenvolvimento sustentável no planeta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b). Este roteiro contou com a contribuição de 194 países durante a 73ª Assembleia Mundial da Saúde em novembro de 2020 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a). As atividades a serem executadas para a eliminação da doença se baseiam em três pilares principais, que são: (i) ação para reduzir a incidência, prevalência, morbidade, incapacidade e morte; (ii) abordagens transversais usando uma prestação integrada de intervenções para DTNs; e (iii) mudança de modelos operacionais para que todos os países possuam programas contra DTNs (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b).

3.1.1. Dados epidemiológicos

Dados publicados pela OMS mostram que a transmissão desta doença ocorre em 78 países (Figura 1), com mais de 200 milhões de pessoas afetadas e mais de 200 mil mortes ocorrendo anualmente (COLLEY *et al.*, 2014; SKELLY; DA'DARA, 2023). Além disso, estimativas apontam que mais de 779 milhões de pessoas estão sob risco de infecção, sendo

85% dessa população habitante do continente africano, que é o mais afetado por esta doença (TEFERA; BELAY; BAJIRO, 2020).

Fora do continente africano, o Brasil é um dos países mais afetados pela doença, onde atualmente, estima-se que mais de 1,5 milhão de pessoas vivem em áreas de risco de contaminação pelo parasito no Brasil e mais de 423 mil casos foram registrados entre os anos de 2009 e 2019. Os estados considerados de transmissão endêmica de esquistossomose são os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais. Outros estados como o Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é considerada focal, não atingindo grandes áreas (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2021).

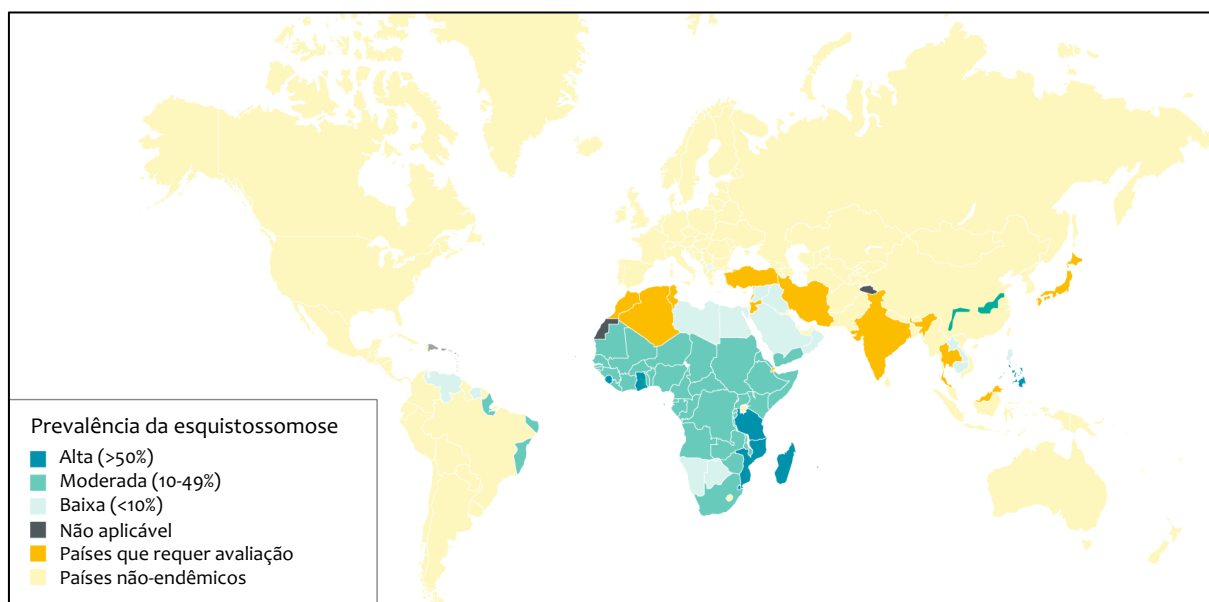


Figura 1. Mapa da prevalência da esquistossomose no mundo. Fonte: Adaptado de MCMANUS et al., (2018).

3.2. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*

O ciclo de vida do *S. mansoni* (Figura 2) possui duas fases distintas para o seu desenvolvimento: a fase sexuada, que ocorre em um hospedeiro definitivo (seres humanos e outros mamíferos), e a fase assexuada, que ocorre no hospedeiro intermediário (moluscos de água doce: *Biomphalaria* sp.) (MCMANUS et al., 2018). Além dos seres humanos, outros hospedeiros vertebrados que podem ser infectados naturalmente pelo parasito são roedores, primatas não-humanos, artiodátilos, insetívoros e procionídeos, que servem como reservatórios

silvestres, ou seja, são indicativos da presença do parasito em uma determinada região (LEGER; WEBSTER, 2017; STANDLEY *et al.*, 2012).

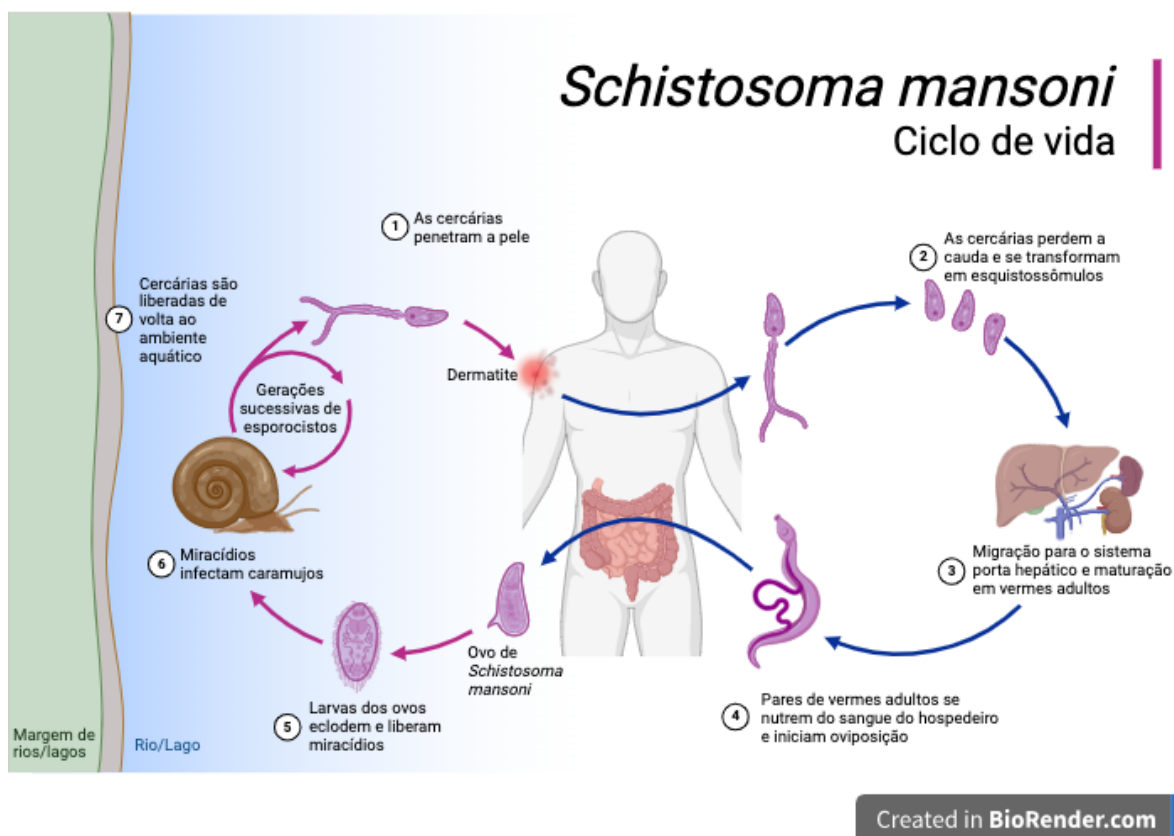


Figura 2. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o website BioRender.com.

3.2.1. Fase assexuada

A fase assexuada do ciclo de vida do *S. mansoni* se inicia a partir da eliminação dos ovos do parasito com as fezes do hospedeiro vertebrado em ambientes aquáticos de pouca movimentação. Então, em condições ótimas de temperatura, luminosidade e oxigenação, as larvas dos ovos eclodem, dando origem a larvas ciliadas natantes denominadas miracídeos e infectam seus hospedeiros intermediários, os moluscos, em resposta aos estímulos do hospedeiro no ambiente aquático (SOUZA *et al.*, 2011; VON BÜLOW *et al.*, 2021).

Durante o processo de penetração do parasito no interior do molusco, os miracídeos se transformam em esporocistos primários, após perderem suas placas ciliadas, que por sua vez, iniciam a replicação de suas células germinais para a formação de esporocistos secundários, em um processo denominado poliembrião. Estes esporocistos passam a colonizar outros tecidos

do molusco e podem dar origem a mais esporocistos secundários ou iniciar a embriogênese para produzir a forma infectante ao hospedeiro definitivo, que são denominadas de cercárias. Cada esporocisto pode formar milhares de cercárias com cauda bifurcada que serão liberadas pelo molusco de volta ao ambiente aquático e estão aptas a infectarem o hospedeiro vertebrado (COLLEY et al., 2014; GRYSEELS, 2012; SOUZA et al., 2011; WANG et al., 2018).

3.2.2. Fase sexuada

A fase sexuada se inicia a partir da penetração das cercárias de *S. mansoni* no hospedeiro definitivo. A penetração ocorre na pele ou na mucosa do hospedeiro vertebrado por esforço mecânico juntamente com a ação de enzimas proteolíticas, uma vez que o hospedeiro entre em contato com águas contaminadas pelas larvas. Ao adentrar o hospedeiro, as larvas sofrem alterações fisiológicas, perdendo sua cauda bifurcada e transformando-se em esquistossômulos que migram subcutaneamente até o coração e, posteriormente, aos pulmões, onde retornam ao coração para serem transportados pela circulação sistêmica para outros órgãos até atingir o sistema portal hepático. Após 25 a 28 dias de seu amadurecimento, finalizam sua maturação para o acasalamento, formando machos e fêmeas adultos (COLLINS *et al.*, 2011; GRYSEELS, 2012).

Após atingir a maturidade sexual, os vermes adultos migram acasalados às vênulas mesentéricas inferiores, onde eles se nutrem do sangue do hospedeiro. Então, a oviposição é iniciada e as fêmeas chegam a produzir de 100 a 300 ovos por dia. Estes ovos podem ficar retidos em órgãos como o fígado e baço, onde uma resposta inflamatória granulomatosa mediada por linfócitos T CD4⁺ é iniciada em torno dos ovos, mas também são capazes de migrar através da parede vascular, na submucosa intestinal ou chegar ao fígado pela circulação portal, facilitando sua passagem para o lúmen intestinal, onde serão eliminados nas fezes do hospedeiro, dando continuidade ao ciclo de vida do parasito (GRYSEELS *et al.*, 2006; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2014; WANGWIWATSIN *et al.*, 2020).

3.3. Hospedeiros da infecção por *S. mansoni*

3.3.1. Hospedeiros intermediários

Durante a fase assexuada do ciclo biológico do *S. mansoni*, a infecção do hospedeiro intermediário pelos miracídios é determinante para a continuidade do ciclo. Portanto, a presença

deste hospedeiro é fundamental pois possibilita a reprodução assexuada do helminto (HAILEGEBRIEL; NIBRET; MUNSHEA, 2022). Os moluscos do gênero *Biomphalaria* estão amplamente distribuídos pelo mundo, com um total de 34 espécies identificadas. Destes, 18 espécies são consideradas potenciais hospedeiros intermediários do *S. mansoni* (AU; WILLIAMS; HUI, 2023). No Brasil, as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* são os hospedeiros intermediários do parasito (Figura 3), sendo a espécie *B. glabrata* a mais importante devido sua ampla distribuição geográfica e alta susceptibilidade à infecção (PEREIRA *et al.*, 2020).

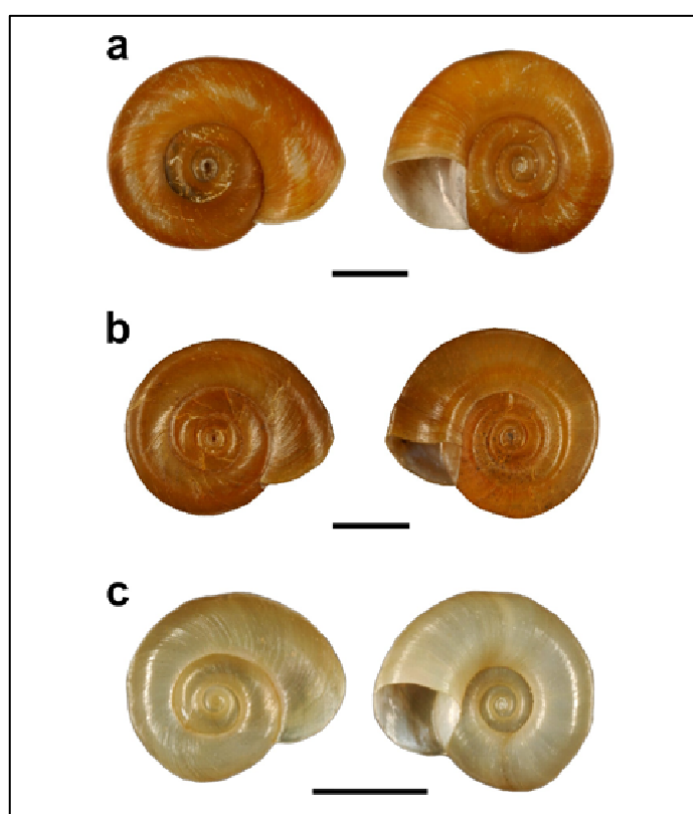


Figura 3. Conchas de (A) *Biomphalaria glabrata*, (B) *Biomphalaria teganophila*, e (C) *Biomphalaria straminea*, hospedeiros intermediários do parasito *S. mansoni*. Fonte: THIENGO *et al.*, (2021).

Normalmente, estes moluscos habitam ambientes aquáticos com pouca correnteza, como córregos e riachos, onde se distribuem em águas rasas com luminosidade moderada próximos de áreas comumente frequentadas por seres humanos (MICHELSON; MOTA, 1982). Sua presença é diretamente afetada por diversos fatores, bióticos ou abióticos, como temperatura, vegetação, precipitações uso do solo, dentre outros (HABIB *et al.*, 2021). Mudanças nestes fatores podem afetar a população de moluscos no ambiente e impactar diretamente a dinâmica de transmissão da esquistossomose (SOUZA; MELO, 2012).

O sucesso na dispersão de espécies de *Biomphalaria* em diferentes regiões é normalmente associado com o surgimento de novos focos de transmissão de esquistossomose devido a facilidade destas espécies se adaptarem a áreas fora do seu habitat natural (HABIB *et al.*, 2021). Logo, o conhecimento da distribuição geográfica de espécies suscetíveis de *Biomphalaria* pode auxiliar na compreensão dos aspectos epidemiológicos da esquistossomose.

3.3.2. Hospedeiros vertebrados

O ser humano é o principal hospedeiro definitivo do *S. mansoni*, abrigando as formas adultas do parasito, onde ocorre a fase sexuada do seu ciclo de vida (PICARD *et al.*, 2016). Sua contaminação ocorre quando o hospedeiro entra em contato com águas contaminadas com as cercárias e, uma vez que estas larvas finalizam seu desenvolvimento no sistema portal hepático, passam a se dispersar acasalados por diversos órgãos do hospedeiro, principalmente no fígado e no intestino (NELWAN, 2019).

A continuidade do ciclo biológico do parasito ocorre a partir da eliminação de seus ovos nas fezes do hospedeiro em ambientes aquáticos, promovendo a contaminação destes ambientes (MOLEHIN, 2020). Como consequência, outras espécies de mamíferos que entrem em contato com estas águas contaminadas podem, eventualmente, se infectar. A literatura reporta a infecção natural de animais silvestres por *S. mansoni*, tais como primatas, marsupiais, roedores, dentre outros (MIRANDA *et al.*, 2022). Entretanto, algumas espécies não apresentam sinais clínicos da doença como acontece em humanos, nem diminuição das taxas de reprodução e sobrevivência, sendo considerados como permissivos ou reservatórios do parasito (RODRIGUES *et al.*, 2022).

3.3.2.1. Reservatórios silvestres (*Nectomys squamipes*)

Em regiões endêmicas, como o Brasil, a presença de *S. mansoni* em animais silvestres é considerado um indício da circulação do parasito naquela área (CATALANO *et al.*, 2018). Todavia, algumas características epidemiológicas nos hospedeiros silvestres são importantes na determinação da disseminação do parasito, como por exemplo, a capacidade do helminto de amadurecer e produzir ovos viáveis no hospedeiro, vida curta dos parasitos nos hospedeiros imunologicamente resistentes, pouco contato do hospedeiro com os corpos d'água contaminados, dentre outros fatores (GENTILE; NETO; SERGIO, 2010).

Portanto, dos vários animais silvestres que podem ser infectados com o *S. mansoni*, os roedores se destacam como os principais reservatórios naturais deste parasito (MIRANDA et al., 2022). No Brasil, as espécies de roedores consideradas como de maior relevância, em áreas endêmicas de esquistossomose humana, são os ratos silvestres *Nectomys squamipes* e *Holochilus brasiliensis*, devido sua ampla distribuição geográfica, com altas taxas de infecção pelo parasito (DO CARMO-SILVA et al., 2019).

A espécie *N. squamipes*, popularmente conhecido como rato d'água (Figura 4), é um roedor silvestre pertencente a família Cricetidae e é encontrado em diferentes regiões do Brasil, principalmente nas regiões de Mata Atlântica e nos estados de Pernambuco, Rio Grande do Sul, Paraíba e Paraná (GENTILE; NETO; SERGIO, 2010). Eles vivem em áreas de estreito contato com coleções de água doce, como córregos e riachos, e as adaptações desta espécie com a vida semiaquática contribuem para o ciclo de transmissão do *S. mansoni* (COSTA-NETO et al., 2013).



Figura 4. O reservatório silvestre *Nectomys squamipes*, popularmente conhecido como rato d'água. Fonte: SILVEIRA, (2018).

A primeira ocorrência da infecção do rato d'água pelo *S. mansoni* foi reportado em 1953 e, a partir de vários estudos subsequentes sobre a interação do parasito nesta espécie, foi possível compreender a participação do rato d'água no ciclo de transmissão do *S. mansoni* (LIMA, D. O.; PINHO; FERNANDEZ, 2016). Dentre os principais achados, foi observado que

o roedor possui uma alta susceptibilidade a diferentes cepas de *S. mansoni*, é capaz de completar o ciclo de transmissão do parasito sem a presença humana, eliminando ovos viáveis nas fezes durante seu tempo de vida. Por isso, atualmente, o rato d'água é considerado o reservatório silvestre de *S. mansoni* mais importante no Brasil (ANTUNES *et al.*, 1971; GENTILE; NETO; SERGIO, 2010; PICOT, 1992).

3.4. Resposta imune do hospedeiro vertebrado

3.4.1. Imunopatogênese

A infecção pelo parasito induz uma resposta imune longa e dinâmica com o parasito ocupando um nicho espacial específico, ou seja, um micro-habitat no interior do hospedeiro (GAUSE; URBAN JR; STADECKER, 2003). Durante as fases iniciais de infecção (esquistossômulo e larvas jovens), a resposta imune inata representa a primeira linha de defesa contra o parasito, a partir do reconhecimento de antígenos derivados do parasito que são fundamentais para a produção de citocinas e quimiocinas, migração celular e resposta adaptativa (LIMA *et al.*, 2024). Receptores de reconhecimento padrão (PRR – *pattern recognition receptors*), principalmente receptores *Toll-like* (TLR), estão envolvidos no reconhecimento de antígenos de *S. mansoni*, principalmente TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 (JENKINS *et al.*, 2005; JENKINS *et al.*, 2005; JOSHI *et al.*, 2008).

Esta resposta é caracterizada pela presença de linfócitos T *helper* (Th), de perfil inicial T *helper* tipo 1 (Th1), com a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (INF- γ) e interleucinas (IL) -1, -2 e -12 (DE JESUS *et al.*, 2002; FALLON; SMITH; DUNNE, 1998; STADECKER; HERNANDEZ, 1998). Nesta fase da infecção, a resposta Th1 do hospedeiro pode causar tosse seca, febre e angioedema, além do aumento da proliferação de eosinófilos na corrente sanguínea (GRYSEELS *et al.*, 2006; JAURÉGUIBERRY; PARIS; CAUMES, 2010).

Com a evolução da infecção para a deposição de ovos dos parasitos pelo verme adulto fêmea, os antígenos solúveis excretados pelos ovos (SEA – *soluble egg antigens*) induzem uma resposta de perfil T *helper* tipo 2 (Th2) dominante (ABDEL AZIZ *et al.*, 2022). Este perfil inflamatório é caracterizado pela presença de IL-4, -5 e -13, além da produção ativa de imunoglobulina E (IgE) (SCHWARTZ; FALLON, 2018). Conforme a doença progride para a fase crônica, o perfil de resposta Th2 é modulado negativamente após seu pico máximo com aproximadamente oito semanas após o início da infecção (PEARCE; MACDONALD, 2002).

3.4.2. Resposta inflamatória granulomatosa

A principal característica da infecção por *S. mansoni* é a resposta inflamatória granulomatosa desenvolvida em torno dos ovos do parasito, principalmente no fígado e no intestino (LLANWARNE; HELMBY, 2021). Os granulomas esquistossomóticos (Figura 5) são estruturas esféricas, bem organizadas e dinâmicas, formadas pelo ovo do parasito e por grupos de células inflamatórias e residentes (eosinófilos, linfócitos T CD4+ e T CD8+, macrófagos e plasmócitos) do tecido que interagem entre si imersos em uma matriz extracelular (MEC) heterogênea (MALTA *et al.*, 2022).

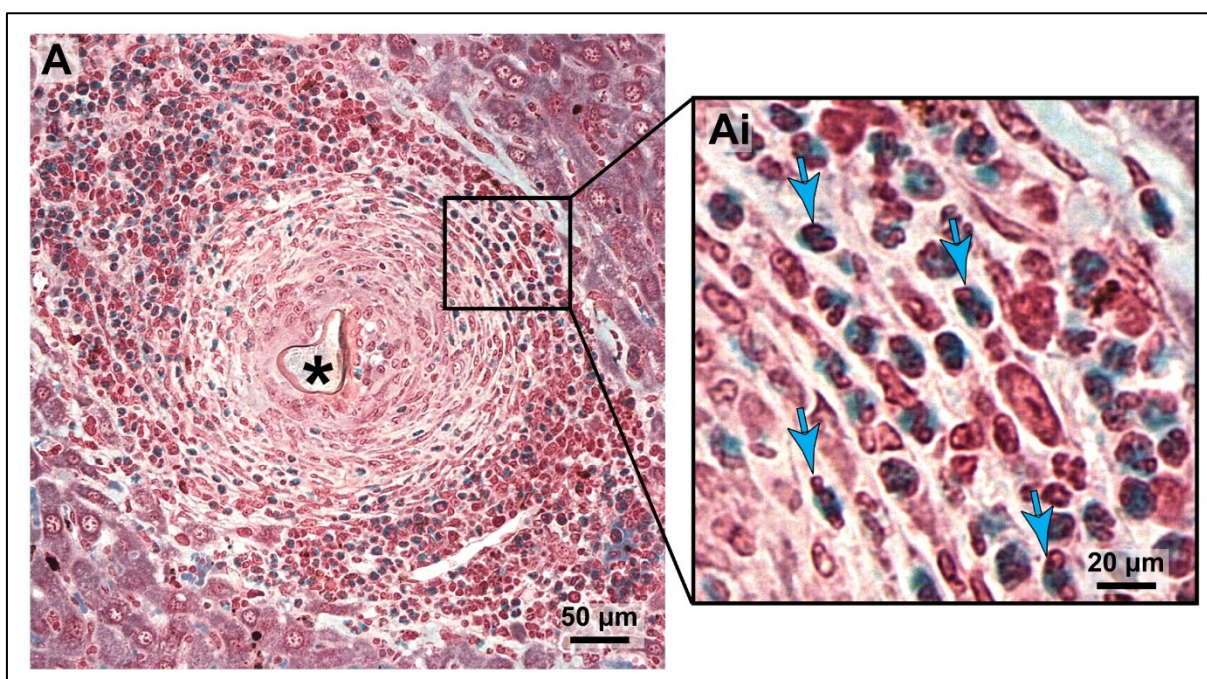


Figura 5. Imagem representativa de um granuloma (A) do fígado de um camundongo infectado por *S. mansoni* corado com Fast Green-Neutral Red. Em (B), eosinófilos destacados com citoplasma corado em verde (indicado nas setas azuis). *: ovo do parasito *S. mansoni*.

Todavia, essa resposta granulomatosa também contribui para o agravamento da doença, devido a acentuada e persistente inflamação, o contínuo acúmulo de eosinófilos nos tecidos afetados pelas SEAs, deposição de colágeno, fibrose e hipertensão portal (HOLZSCHEITER *et al.*, 2014). Sendo assim, de acordo com a magnitude do evento inflamatório inicial e a reparação fibrosa a partir do processo de imunomodulação subsequente, os granulomas são classificados

como elemento-chave no curso geral e na gravidade da doença (LLANWARNE; HELMBY, 2021).

3.4.3. Arquitetura do granuloma

Os granulomas hepáticos possuem, como função principal, a proteção do tecido hepático, isolando as toxinas secretadas pelos ovos (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018; TAKAKI *et al.*, 2021). Já no intestino, os granulomas possuem a função de carrear os ovos do parasito até a luz do intestino para que estes ovos sejam eliminados nas fezes do hospedeiro promovendo a continuidade do ciclo de vida do parasito (AMARAL *et al.*, 2017).

Durante sua formação, os granulomas passam por mudanças morfológicas em sua composição celular e na MEC, que seguem eventos específicos associados a migração celular, e interações célula-célula, célula-ovo e célula-MEC (CHUAH *et al.*, 2014; MALTA *et al.*, 2021). Portanto, os granulomas possuem uma variação morfológica singular (Figura 6), apresentando uma variedade de volume e composição celular dependendo do seu estágio de desenvolvimento (AMARAL *et al.*, 2017; LENZI *et al.*, 1998). Na literatura existem diversas classificações de estágios de granulomas durante sua formação, progredindo de uma forma imatura (fase pré-granulomatosa) para uma forma madura (fase granulomatosa) e, por fim, uma forma involucional (fase de cura por fibrose) (LENZI *et al.*, 1998; LINS *et al.*, 2008).

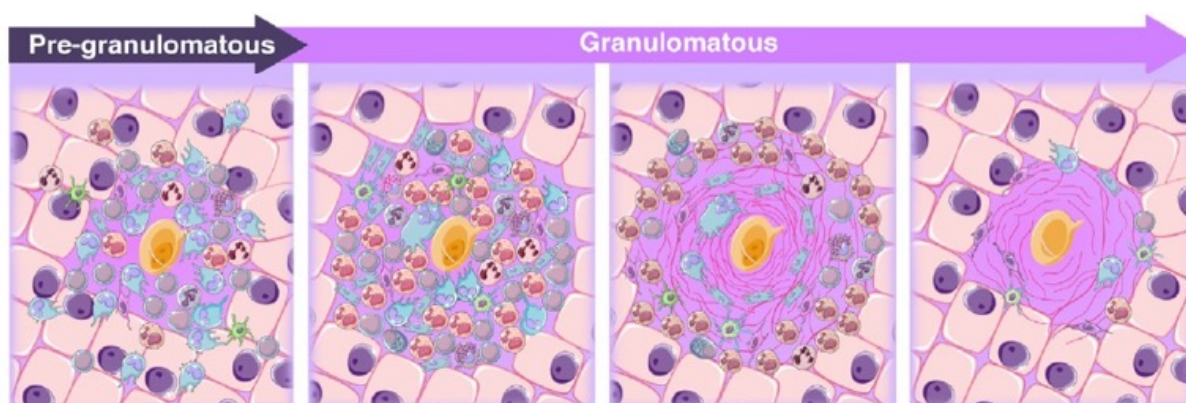


Figura 6. Representação da microarquitetura de granulomas esquistossomóticos em seus diferentes estágios de desenvolvimento. Fonte: Adaptado de MALTA *et al.*, (2021).

Inicialmente, células inflamatórias são recrutadas de forma intensa da corrente sanguínea ao parênquima hepático e ocupam espaços ao redor do ovo do parasito. Depois, o granuloma passa a amadurecer e apresentar uma forma mais esférica e as células inflamatórias

passam a ocupar as diferentes camadas dentro da estrutura formada. Então, o tecido passa a ser reparado, com a produção de fibras da MEC, principalmente fibras colágenas e a quantidade de células inflamatórias passa a diminuir e ocupar espaços mais distantes do ovo do parasito. Por fim, o granuloma inicia sua involução, diminuindo seu volume e acúmulo celular e aumentando a camada de fibras colágenas (MALTA *et al.*, 2021, 2022).

3.5. Eosinófilos

3.5.1. Aspectos gerais

Eosinófilos são células do sistema imune inato encontradas em pequeno número no sangue (menos de 5%) e em maior número em tecido de diversos órgãos, principalmente no intestino (KLION; ACKERMAN; BOCHNER, 2020; O’SULLIVAN; BOCHNER, 2018). Estas células são notavelmente conhecidas pela sua morfologia característica, como um núcleo multilobulado, visto principalmente com dois lóbulos e uma população de grânulos secretores, também denominados de específicos, que ocupam grande parte do citoplasma (MELO; DVORAK; WELLER, 2022; MELO; WELLER, 2018).

Os grânulos de eosinófilos armazenam uma quantidade elevada de proteínas catiônicas (básicas), as quais conferem a acidofilia típica do citoplasma de eosinófilos, quando observados sob microscopia de luz (Figura 7). Quatro tipos de proteínas catiônicas encontram-se armazenadas nesses grânulos: Proteína Básica Principal (MBP – *Major Basic Protein*)-1, Proteína Catiônica Eosinofílica (ECP – *Eosinophil Cationic Protein*), também conhecida como RNase3, Peroxidase Eosinofílica (EPX – *Eosinophil Peroxidase*), Neurotoxina Derivada do Eosinófilo (EDN – *Eosinophil-Derived Neurotoxin*), também conhecida como RNase2 (WELLER; SPENCER, 2017). Além disso, inúmeras citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e mediadores lipídicos se encontram armazenados, principalmente pré-formados, nos grânulos de eosinófilos, com diversas funções biológicas (WELLER; SPENCER, 2017).

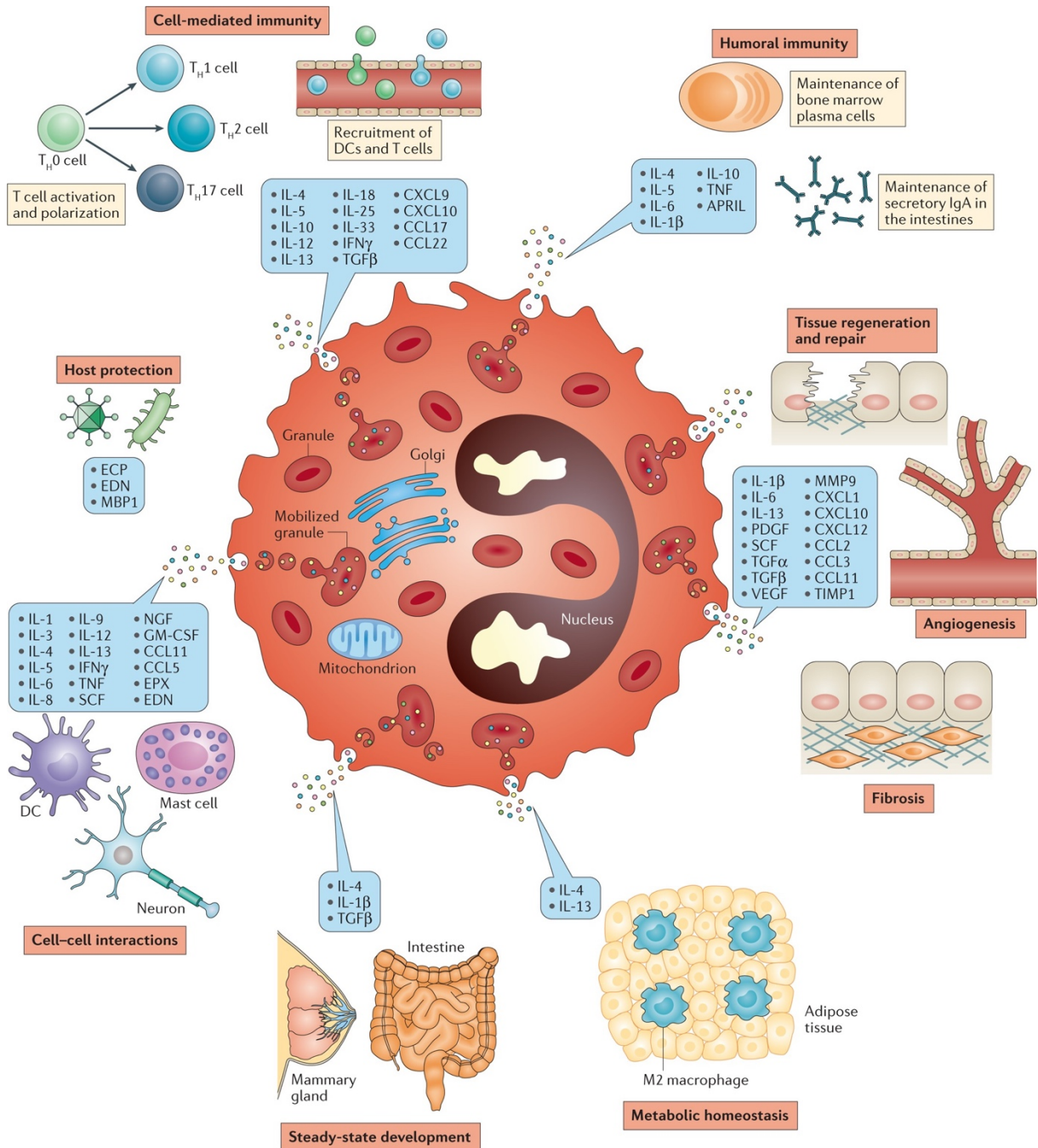


Figura 7. Mediadores derivados de eosinófilos e suas funções. Fonte: WELLER; SPENCER, (2017).

Sob microscopia eletrônica de transmissão (MET), os eosinófilos apresentam características ultraestruturais únicas (Figura 8). Eosinófilos maduros são facilmente reconhecidos pela morfologia de seus grânulos, os quais exibem uma estrutura interior centralizada elétron-densa, denominada cristalóide, com uma matriz envoltória elétron-lúcida e delimitada por membrana. O núcleo bi ou polilobulado aparece com heterocromatina predominantemente periférica. Eosinófilos possuem ainda estruturas tubulovesiculares com

morfológica típica ao MET, denominadas de vesículas sombreros (*Eosinophil Sombrero Vesicles* – EoSVs) e corpúsculos lipídicos, também denominados de gotículas lipídicas, com elétron-densidade acentuada (MELO *et al.*, 2013; MELO; WELLER, 2014).

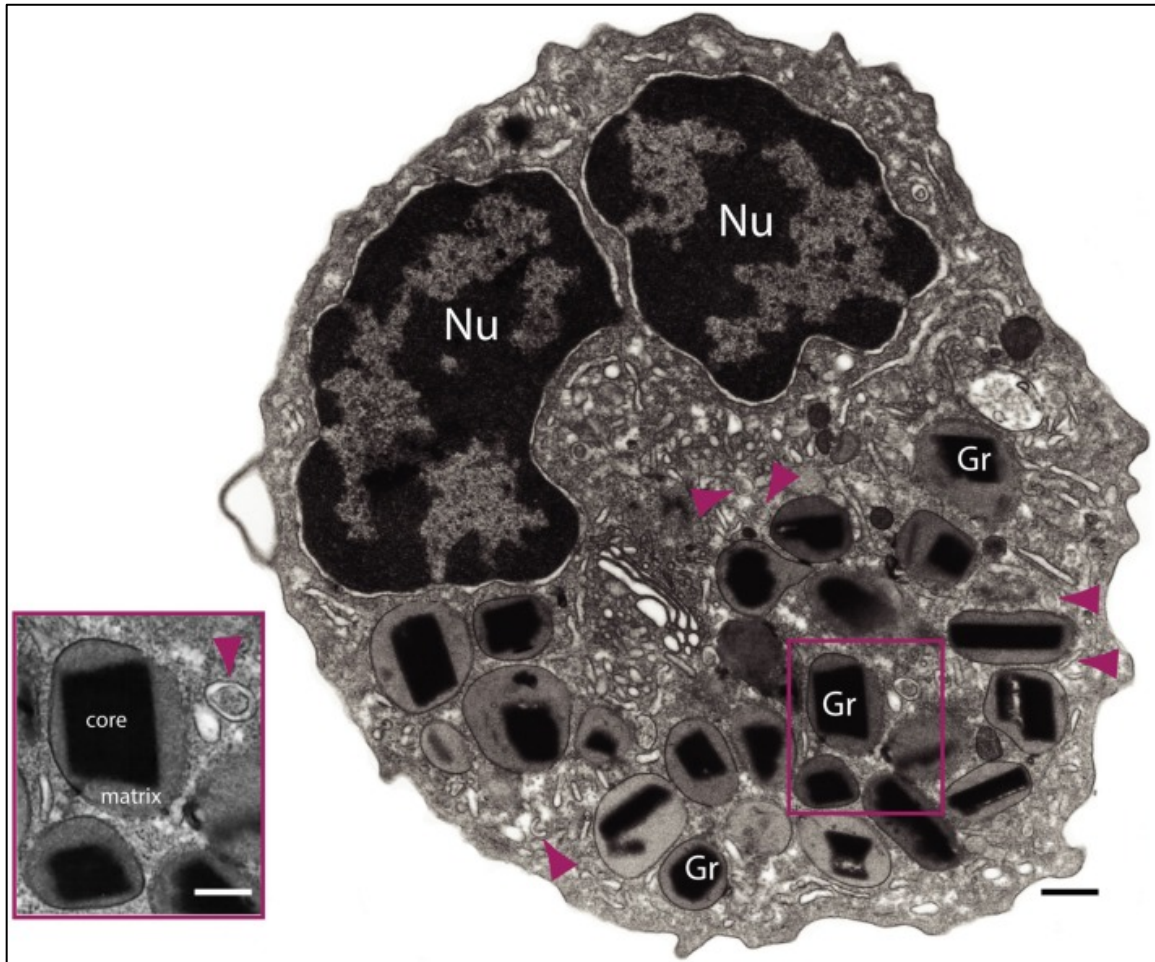


Figura 8. Características ultraestruturais de um eosinófilo maduro humano. Note o típico núcleo (Nu) bilobulado e EoSVs (pontas de setas). A área destacada apresenta grânulos secretores (específicos) e EoSVs em maior aumento. Barras = 500 nm; 300 nm (área destacada). Fonte: Adaptado de SPENCER *et al.*, (2014).

Historicamente, principalmente no contexto de infecções helmínticas, os eosinófilos são considerados células efetoras, com capacidade de atuar diretamente contra parasitos (MASAMBA; KAPPO, 2021; MELO *et al.*, 2013; WELLER; SPENCER, 2017). Entretanto, a visão do eosinófilo atualmente é o de uma célula multifuncional com atividades imunoreguladoras, com habilidade de imunomodulação das respostas inata e adaptativa contra patógenos, além do seu envolvimento na homeostase e reparo tecidual (MELO *et al.*, 2013; MELO; WELLER, 2018). Isso ocorre a partir da resposta imune mediada por células do tipo

Th2, incluindo a produção de IL-5, que aumenta a ativação eosinofílica. Neste processo, denominado eosinofilia, o número de eosinófilos pode aumentar acentuadamente tanto no sangue como nos tecidos afetados (WELLER; SPENCER, 2017).

3.5.2. Maturação e ativação de eosinófilos

Na medula óssea, células-tronco hematopoiéticas multipotentes se diferenciam e originam diversas linhagens celulares, incluindo basófilos, neutrófilos e eosinófilos (BLANCHARD; ROTHENBERG, 2009). A diferenciação de eosinófilos a partir de fatores de transcrição oriundos de progenitores pluripotentes leva à formação de precursores de eosinófilos comprometidos com a linhagem eosinofílica. Uma vez estabelecido esse comprometimento, ocorrem posteriormente eventos de maturação e proliferação de eosinófilos, direcionados principalmente através de sinalização do microambiente (MELO; DVORAK; WELLER, 2022). Em eosinófilos, a IL-5 é a principal citocina responsável por induzir a diferenciação destes precursores em linhagens eosinofílicas (BRUIN et al., 2010).

Com o auxílio de MET, é possível observar os processos de maturação, ativação e secreção de eosinófilos e suas principais características ultraestruturais, favorecendo percepções interessantes sobre sua função biológica durante a homeostase ou eventos inflamatórios (AKUTHOTA *et al.*, 2016; MAZZEO *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2008, 2013; WECHSLER *et al.*, 2021). Em células imaturas, os principais aspectos ultraestruturais são a presença de um núcleo eucromático, com poucos grânulos que estão homoganeamente densos, um maior volume celular com a presença de diversas organelas como retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e mitocôndrias (MELO; WELLER, 2018). Ao iniciar o processo de maturação e diferenciação, estas células passam a produzir mais grânulos, segmentar seu núcleo, apresentando mais heterocromatina, redução na quantidade e volume de organelas e produção de corpúsculos lipídicos (MELO; DVORAK; WELLER, 2022). Ao final do processo, estas células passam a apresentar uma morfologia característica de uma célula madura, conforme descrito no tópico anterior (item 3.5.1).

Sob ativação, ocorrem diversas alterações morfológicas de eosinófilos, observadas principalmente por MET (MELO; SILVA, 2024). As principais alterações são (Figura 9): i) alterações estruturais acentuadas dos grânulos de secreção relacionadas com a desestruturação do cristalóide e perda de conteúdo; ii) aumento na formação de vesículas sombrieros; iii) formação e acúmulo de corpúsculos lipídicos; iii) remodelagem da população de mitocôndrias.

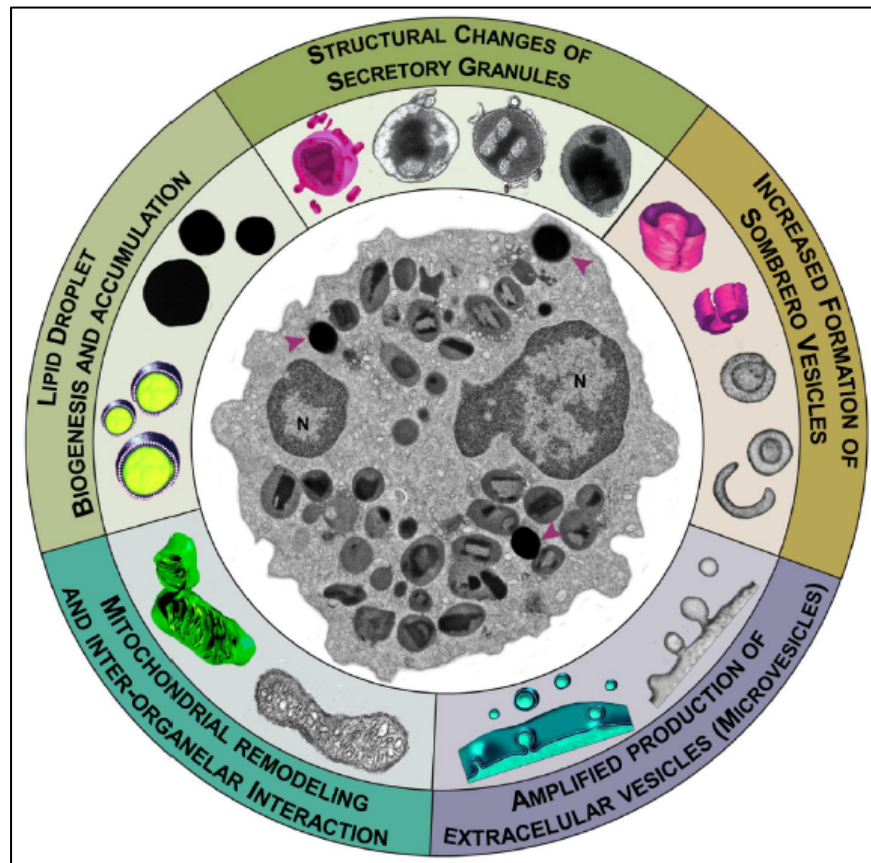


Figura 9. Mudanças morfológicas observadas na ultraestrutura de eosinófilos durante seu processo de ativação em respostas imunes. **N:** núcleo; **Pontas de setas:** corpúsculos lipídicos. Fonte: Adaptado de MELO; SILVA, (2024).

Doenças inflamatórias caracterizadas pelo recrutamento e ativação de eosinófilos (modelos murinos de asma, infecção pelo vírus H1N1 influenza A [IAV] e esquistossomose) induzem remodelamentos de crista significantes em eosinófilos teciduais. Comparados com eosinófilos residentes, mitocôndrias em eosinófilos inflamatórios mudam a conformação de suas cristas com proporções variadas da morfologia lamelar, tubular e mista. Além disso, o número e volume de cristas na população mitocondrial de eosinófilos teciduais exibiu variações, aumentando ou diminuindo, dependendo do contexto do microambiente ou doença (BONJOUR *et al.*, 2022).

3.5.3. Processos de secreção de eosinófilos

Em resposta à ativação, os eosinófilos liberam o conteúdo de seus grânulos com a finalidade de regular a resposta imune de acordo com os estímulos externos (HOGAN *et al.*, 2008). Os produtos armazenados nos grânulos são liberados para o meio extracelular a partir

de três processos principais de secreção: exocitose (clássica e composta), desgranulação por piecemeal (PMD) e citólise (Figura 10).

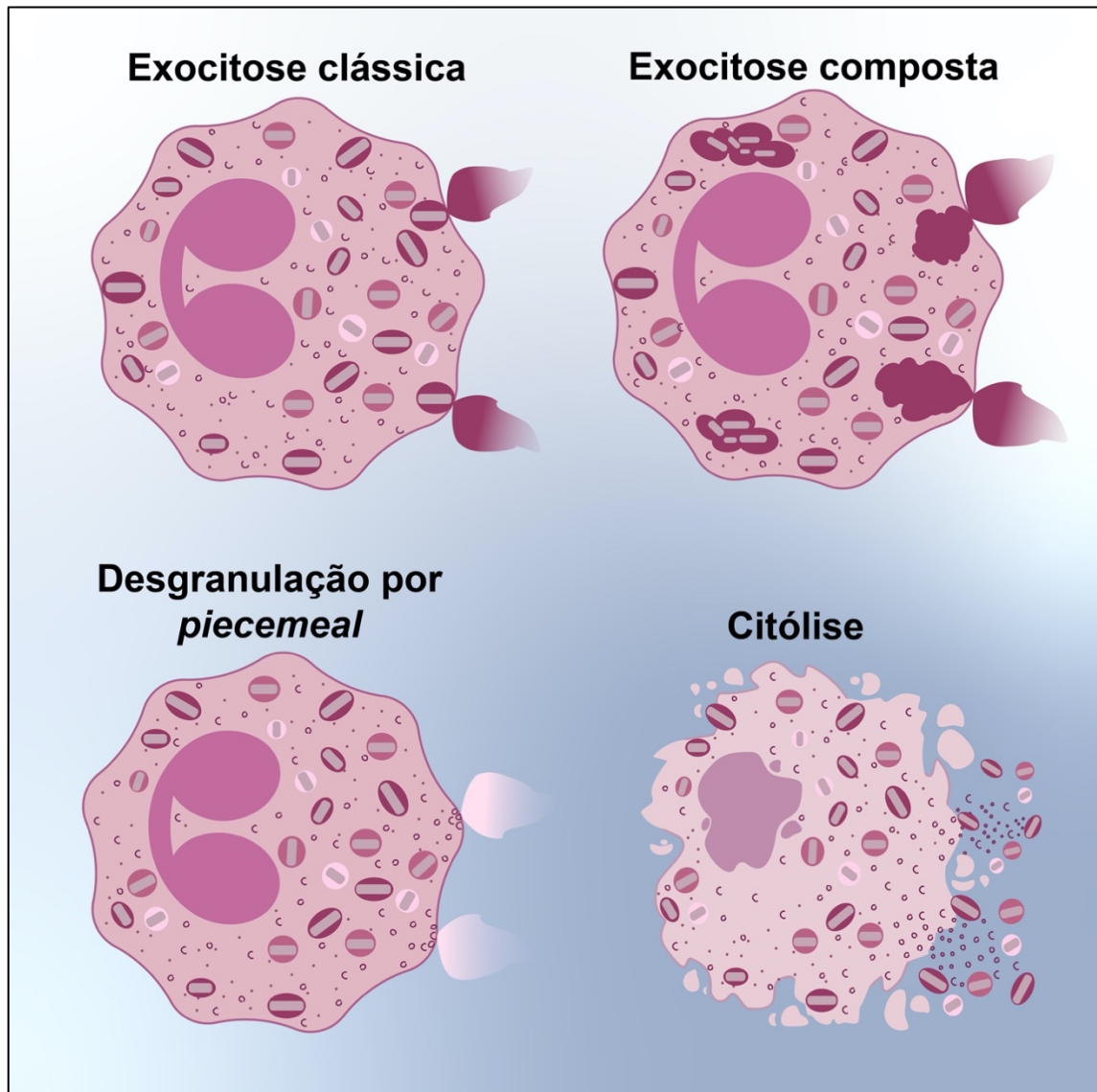


Figura 10. Processos de secreção de eosinófilos após estímulos externos, liberando seu conteúdo para o meio extracelular.

3.5.3.1. Exocitose

A exocitose é um evento de desgranulação raro *in vivo*, mas pode ser observada *in vitro* com os eosinófilos interagindo em diferentes doenças humanas (MELO; WELLER, 2010). Em ultraestruturas, a exocitose pode ser identificada pela fusão de grânulos individuais com a membrana plasmática (exocitose clássica) ou pela fusão de vários grânulos específicos,

formando câmaras de desgranulação no citoplasma antes de se fundir com a membrana (exocitose composta) (MELO; WELLER, 2018; MIYABE *et al.*, 2021).

A exocitose clássica é altamente regulada em uma série de eventos: (i) mobilização ou translocação de grânulos para a periferia da célula; (ii) ligação granular com a membrana plasmática; (iii) acoplamento entre o grânulo e a membrana celular; e (iv) fusão das membranas e liberação de mediadores (LOGAN *et al.*, 2002). Por outro lado, na exocitose composta, o aspecto mais característico deste evento é o grânulo estruturalmente desarranjado com uma matriz elétron-lúcida (MELO; DVORAK; WELLER, 2022). Consequentemente, os grânulos fusionados podem ser observados com uma câmara vazia devido a liberação completa dos seus compostos (CARMO *et al.*, 2016). Outra característica presente na exocitose composta é a ocorrência de múltiplos cristaloides dentro de um único grânulo ou de uma câmara grande (MELO; DVORAK; WELLER, 2022).

3.5.3.2. Desgranulação por piecemeal (PMD)

PMD é um processo de secreção de grânulos intracelulares mediado pelo transporte de vesículas, que são mobilizados para transferir seu conteúdo secretor dos grânulos para a superfície celular (MELO *et al.*, 2008). Este processo foi descrito pela primeira vez na década de 1970 em basófilos humanos em respostas alérgicas da pele (DVORAK; DVORAK, 1975) e posteriormente evidenciado em estudos com MET de eosinófilos intestinais de pacientes com doença de Crohn (DVORAK *et al.*, 1980). A característica mais observada em PMD é a presença de áreas lúcidas em cores de grânulos específicos que estão relacionados a perda de conteúdo (MELO *et al.*, 2005).

Desde então, este processo tem sido identificado *in vivo* em diversos estudos de eventos e condições inflamatórias humanos, incluindo asma (SHAHANA *et al.*, 2005), pólipos nasais (ARMENGOT; GARÍN; CARDA, 2009), rinite alérgica (MALM-ERJEFÄLT *et al.*, 2005), colite ulcerativa (ERJEFALT *et al.*, 2001), dermatite atópica (MALM-ERJEFÄLT *et al.*, 2005), dispepsia funcional (VANHEEL *et al.*, 2018), carcinoma gástrico (CARUSO; IRATO; RIGOLI, 2022), shigelose (RAQIB *et al.*, 2003) e cólera (QADRI, 2004).

O termo PMD foi criado devido a liberação dos conteúdos dos grânulos “*piece by piece*” (MELO; WELLER, 2010) e é caracterizado pelo esvaziamento gradual do conteúdo granular, mas mantendo sua estrutura intacta (MELO *et al.*, 2005). Os grânulos mobilizados podem apresentar diferentes níveis de esvaziamento do seu conteúdo com diferentes morfologias, incluindo o desarranjo de matriz/cristaloide, áreas elétron-lúcidas em sua estrutura interna,

baixa elétron densidade e cristaloides residuais (MELO; DVORAK; WELLER, 2022; MELO; WELLER, 2010).

Durante o processo de PMD de eosinófilos humanos, outros conteúdos que podem ser liberados para o meio extracelular são produtos encapsulados por vesículas tubulares delimitadas por uma bicamada lipídica, denominadas EoSVs (MELO; DVORAK; WELLER, 2022; RODRIGO-MUÑOZ *et al.*, 2024). EoSVs são capazes de interagir e brotar de grânulos secretores e recebem esse nome em referência a aparência similar ao típico “chapéu mexicano” (sombreiro) em secções transversais de MET convencional (MELO *et al.*, 2008). Estas vesículas interagem com outras organelas e auxiliam no transporte de diversos mediadores imunes, além de possuírem uma característica marcante na desgranulação citolítica de eosinófilos no contexto de algumas doenças humanas (CARMO *et al.*, 2016; MELO; WELLER, 2016, 2018; NEVES *et al.*, 2024).

3.5.3.3. Citólise

Similar ao que ocorre em PMD, a citólise ou desgranulação lítica é um processo de secreção comumente encontrado em eosinófilos inflamatórios *in vivo* e é caracterizado pela deposição de grânulos intactos ligados à membrana, com seu cristalóide único em tecidos e secreções após morte celular (THOMPSON-SOUZA; VASCONCELOS; NEVES, 2022). Os sinais morfológicos de citólise incluem a perda inicial da integridade da membrana plasmática, ruptura completa da membrana nuclear e plasmática com descondensação da cromatina e dissolução, ou células com um alto grau de dissolução com o desaparecimento da maioria das organelas (MELO; DVORAK; WELLER, 2022).

Como resultado, grânulos intactos liberados após a citólise em sítios inflamatórios podem ser observados individualmente e como grupos de grânulos extracelulares livres (FEGs – *free extracellular granules*, em inglês) e atuam como biomarcadores eosinofílicos (PERSSON; ULLER, 2014). Os aspectos ultraestruturais das FEGs têm sido amplamente estudados em diversas doenças, incluindo asma, rinite, esofagite eosinofílica e outras doenças eosinofílicas (NEVES; WELLER, 2009).

3.5.4. Eosinófilos no contexto da infecção por *S. mansoni*

Durante processos infecciosos por helmintos, os eosinófilos tradicionalmente possuem um papel importante na proteção do hospedeiro a partir da liberação dos produtos de seus

grânulos citoplasmáticos os quais contêm várias moléculas tóxicas, que são liberadas no meio extracelular em resposta aos estímulos antigênicos (MALIK; BATRA, 2012). No contexto da esquistossomose mansônica, o acúmulo de eosinófilos na medula óssea e no sangue periférico é uma característica predominante da infecção. Essa característica também é observada nos tecidos do hospedeiro ao redor do esquistossômulo invasor e dos ovos do parasito (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022).

Em estudos anteriores do grupo, exploramos o granuloma esquistossomótico como um ecossistema integrado em constante evolução, com progressivas mudanças estruturais e funcionais e não somente um local onde uma comunidade de células é estabelecida (MALTA *et al.*, 2021). Diversas populações celulares são encontradas nos granulomas, incluindo eosinófilos. Durante o processo infeccioso, a eosinofilia normalmente ocorre em dois picos distintos, ambos na fase aguda da doença. Nos granulomas, durante o pico da infecção, mais de 50% da composição celular são de eosinófilos. Já na fase crônica, a quantidade de eosinófilos nos granulomas tende a diminuir (LENZI; LENZI; SOBRAL, 1987). No entanto, o papel dos eosinófilos na esquistossomose mansônica ainda é pouco entendido. Classicamente, estas células são associadas a resposta do hospedeiro a infecção helmíntica com uma função protetiva ao hospedeiro e helmintotóxica (SHIN; LEE; MIN, 2009). Estudos *in vitro* indicam a função efetora de eosinófilos contra os diferentes estágios de desenvolvimento do parasito *S. mansoni* (esquistossômulo, pares de vermes adultos, ovos do parasito) (REIMERT *et al.*, 2006). O MBP é uma das proteínas catiônicas mais relacionadas a função helmintotóxica durante o processo de secreção de eosinófilos, sendo capazes de eliminar até as larvas miracídios dentro dos ovos do parasito (BUTTERWORTH *et al.*, 1979).

Entretanto, este conceito de que os eosinófilos são células efetoras não tem sido suportado em estudos *in vivo*. Estudos mais recentes vem mudando a visão de eosinófilos como células efetoras citotóxicas para um papel mais imunorregulador na imunidade inata e adaptativa às infecções parasitárias, incluindo a infecção por *S. mansoni* (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013; MITRE; KLION, 2021). Permanece obscuro se estas células atuam como células efetoras contra o parasito; imunomoduladores da resposta imune; participantes do metabolismo tecidual ou meramente operadores na remodelagem e eliminação de restos celulares após dano tecidual (MALTA *et al.*, 2022).

4. JUSTIFICATIVA

A formação de granulomas é o achado histopatológico mais marcante da esquistossomose. O granuloma é um sistema biológico complexo, formado por diversas populações celulares que são recrutadas durante o seu desenvolvimento e passam a habitar dentro dos limites dessa estrutura de notável arquitetura (MALTA *et al.*, 2021, 2022). Em um trabalho recente, nosso grupo propôs que o granuloma funciona como um verdadeiro ecossistema e que o entendimento da dinâmica das populações celulares e suas interações dentro do granuloma pode ser crucial para o entendimento da doença (MALTA *et al.*, 2021).

Nosso grupo tem especial interesse em investigar a população de eosinófilos no contexto dos granulomas esquistossomóticos. Conforme ressaltado acima, apesar do intenso acúmulo de eosinófilos nos tecidos, o papel dessa célula permanece controverso e pouco entendido (MALTA *et al.*, 2022). Considerando que o granuloma sofre alterações progressivas ao longo do tempo, as principais perguntas deste trabalho são: i) Qual a distribuição espacial de eosinófilos durante os diferentes estágios evolutivos dos granulomas?; ii) Existem diferenças quanto à dinâmica espaço-temporal de eosinófilos quando se compara a infecção experimental com a natural?; iii) Dentro de um mesmo estágio evolutivo de granuloma, ocorre distribuição diferencial de eosinófilos em regiões distintas do mesmo?

Para responder essas perguntas, iremos estudar granulomas formados em um dos órgãos-alvo principais da doença, o fígado, e usando dois modelos de infecção – experimental (camundongos) e natural (*Nectomys squamipes*), tanto na fase aguda como na crônica. As estratégias metodológicas envolvem aplicação de *Whole Slide Imaging* (WSI), a qual permite escanear digitalmente cortes inteiros do órgão e seus granulomas e reconstruir em três dimensões (3D) (AMARAL *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2020).

Os modelos experimentais murinos são extensivamente utilizados nos estudos de infecção por *S. mansoni* e para o entendimento da biologia dos eosinófilos durante a resposta inflamatória granulomatosa (FALLON, 2000; SCHWARTZ; FALLON, 2018). Além disso, outra forma de investigar o papel dos eosinófilos neste contexto é a partir de estudos em modelos de infecção natural, como a infecção em *N. squamipes*, um dos principais reservatórios silvestres de áreas endêmicas do Brasil e que desenvolve a infecção mas com notável adaptação ao parasito (AMARAL *et al.*, 2017).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Modelo de infecção experimental por *S. mansoni*

5.1.1. Animais, infecção e comitê de ética

Camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster* (n=12) com aproximadamente 70 dias de idade foram utilizados para todos os experimentos. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os animais foram divididos em grupos de seis e colocados em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável e maravalha de pinho branco autoclavada. Os animais foram mantidos à temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com umidade relativa do ar em torno de 70 % e manutenção de ciclo claro-escuro constante (período claro de 06 às 18 horas). As trocas das camas de maravalha foram feitas duas vezes por semana.

A infecção foi realizada no Laboratório de Esquistossomose e Helminologia do Departamento de Parasitologia da UFMG, onde a cepa LE/BH de *S. mansoni* é mantida rotineiramente. Os animais foram inoculados subcutaneamente na região cervical com cerca de 100 cercárias/animal de *S. mansoni* (PELLEGRINO; MACEDO, 1955). A infecção foi confirmada pela presença de ovos nas fezes dos animais na quinta semana de infecção (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934). Todos os parâmetros clássicos confirmatórios de uma infecção aguda completamente desenvolvida, como hepatomegalia, alta densidade de ovos do parasito no fígado, inflamação granulomatosa bem caracterizada ao redor dos ovos depositados, alteração de enzimas hepáticas, níveis aumentados de citocinas Th2 e um infiltrado extensivo de eosinófilos tem sido consistentemente demonstrado neste modelo (AMARAL *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2018).

Para garantir a quantidade de larvas para inoculação dos animais, as cercárias foram diluídas e homogeneizadas em água deionizada e contabilizadas em estereomicroscópio (Zeiss Stemi SV11, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha) até que atingissem a concentração final de inoculação. Os caramujos (*Biomphalaria glabrata*) utilizados para a liberação das cercárias foram previamente infectados com miracídios oriundos de fígados de *Mesocricetus auratus* infectados, acondicionados em aquários em condições ideais de temperatura e expostos a luz artificial após 30 dias de infecção para liberação das cercárias (LEWIS *et al.*, 1986).

Todos os animais foram monitorados diariamente para avaliações de sobrevivência e bem-estar. Todos os procedimentos experimentais estão em conformidade com as diretrizes

éticas da Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ; CEUA/FIOCRUZ, LW-32/2012). Nenhum animal faleceu em período anterior aos desfechos experimentais.

5.1.2. Eutanásia e obtenção do órgão para experimentação

A eutanásia dos animais infectados e não-infectados ocorreu após 55 e 120 dias de infecção, que correspondem aos períodos de fase aguda e crônica da doença (DIAS *et al.*, 2018). Os animais foram eutanasiados a partir de aprofundamento anestésico com cloridrato de ketamina (100 mg/mL – Quetamina injetável, Vetnil[®], Louveira, SP) associado à acepromazina (10 mg/mL – Acepran gotas, Vetnil[®], Louveira, SP) na proporção de 9:1. A dose administrada foi de 0,15 mL de anestésico a cada 100 g de peso do roedor (HAWK; LEARY; MORRIS, 2005). Por fim, a exsanguinação (sangria total) foi realizada através de punção cardíaca, sem anticoagulante. Os animais foram perfundidos com solução salina a 1,8% inoculada ao ventrículo direito por um perfusor Brewer[®] (Automatic Pippeting Machine, model 40A, Scientific Equipment Products, Baltimore, MA, EUA) e, ao final do procedimento, os animais foram pesados e os fígados foram coletados e processados.

5.2. Modelo de infecção natural por *S. mansoni*

5.2.1. Área de estudo, captura e comitê de ética

A espécie neotropical e semiaquática *N. squamipes*, também conhecida como rato d'água, é um hospedeiro natural de *S. mansoni* no Brasil com ampla distribuição geográfica (GENTILE *et al.*, 2006; LIMA, D. O.; PINHO; FERNANDEZ, 2016). Espécimes de *N. squamipes* foram capturados em uma área endêmica (município de Sumidouro, RJ; 22°02'46'' Sul, 42°41'21'' Oeste) pela equipe técnica do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ), conforme trabalho prévio (AMARAL *et al.*, 2017; GENTILE; NETO; SERGIO, 2010; VARELLA *et al.*, 2024).

Brevemente, foram estabelecidos transectos de captura ao longo dos córregos e canais de irrigação das áreas rurais, que constituem o habitat do roedor. Armadilhas metálicas do tipo Tomahawk[®], medindo 40 x 64 x 12,7 cm, foram utilizadas para a captura de pequenos mamíferos terrestres vivos. Cada armadilha estava distante 15 metros umas das outras, estando dispostas no chão. Uma isca contendo pasta de amendoim, banana, aveia e bacon foi utilizada

para atrair os animais. Durante 5 dias, a cada manhã, as armadilhas eram checadas para verificação da presença de animais.

As expedições para captura dos animais foram autorizadas por Licença Permanente de coleta/captura em todo território nacional, pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, licença #13373-1). Todos os procedimentos com os animais foram realizados em campo e seguiram as diretrizes para a captura, manuseio e cuidado dos animais, de acordo com as normas de biossegurança nível três e segundo protocolo aprovado pela CEUA/FIOCRUZ (LW-81/12 e L-036/2018). Os protocolos de biossegurança e equipamentos de proteção individual, incluindo respiradores de biossegurança nível três, foram utilizados durante todos os procedimentos envolvendo manuseio de animais e coleta de amostras biológicas.

5.2.2. Eutanásia e obtenção do órgão para experimentação

Os roedores capturados foram avaliados para confirmação da infecção por *S. mansoni* e/ou outros parasitos, conforme procedimentos rotineiros e divididos em dois grupos (infectados ou não-infectados – n=12, sendo 6 por grupo). Animais infectados foram identificados pela presença de vermes adultos nas veias mesentéricas a partir de perfusão do sistema porta-hepático e pela confirmação de ovos do parasito em exames de fezes (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934; SMITHERS; TERRY, 1965). A eutanásia foi feita de forma semelhante ao descrito no item 5.1.2. Ao final do procedimento, os animais foram pesados e os fígados foram coletados e processados.

5.3. Processamento das amostras para análises histológicas

Fragmentos do fígado (lóbulo direito), de aproximadamente 5 mm³ dos animais eutanasiados (*Swiss* e *N. squamipes*), infectados e não-infectados, foram fixados imediatamente em solução de paraformolaldeído (Sigma-Aldrich) a 4% e mantidos *overnight* a 4 °C. Depois, os fragmentos foram transferidos para uma solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e mantidos nesta solução a 4 °C até o início do processamento histológico.

5.3.1. Inclusão em resina glicolmetacrilato (GMA)

Para as análises histopatológicas, o método de inclusão em resina glicolmetacrilato (GMA) foi aplicado (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Biosystems, Heidelberg, Alemanha), conforme estudos anteriores do grupo de pesquisa (AMARAL *et al.*, 2017; CHIARINI-GARCIA; PARREIRA; ALMEIDA, 2011; DIAS *et al.*, 2018). Primeiramente, os fragmentos dos tecidos foram lavados em solução tampão de 10 a 15 minutos e posteriormente desidratados em uma série crescente de diferentes soluções alcoólicas (álcool 70°, 80°, 90° e 100° por duas vezes) durante 20 minutos cada. Após a desidratação, ocorreu a etapa de infiltração em duas sequências de resinas, uma por 2 horas e outra *overnight*. No dia seguinte, os fragmentos foram retirados da resina e colocados em formas próprias que contém solução de inclusão, acondicionadas em recipiente gelado duas horas antes da inserção dos fragmentos na solução, para evitar a retração do tecido, pois a polimerização do GMA constitui uma reação exotérmica, logo, ocorre alta produção e liberação de calor. Por fim, a polimerização foi finalizada depois de dois dias em temperatura ambiente e uma resina acrílica de dentista (Jet, Dental Cremer, Blumenau, SC) foi acrescentada aos blocos de GMA a fim de colar os blocos aos suportes de madeira para a posterior etapa de microtomia.

5.3.2. Inclusão em parafina (Paraplast Plus®)

Além disso, outra parte dos fragmentos dos tecidos fixados foram incluídos em parafina com polímeros plásticos (Paraplast Plus®, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Brevemente, estes fragmentos foram submetidos a etapas de desidratação em séries crescentes de soluções alcoólicas (álcool 70°, 80°, 95° e 100° por duas vezes) durante 20 minutos cada, seguido da etapa de diafanização em solução de xilol durante 15 minutos por duas vezes. Em seguida, realizou-se a etapa de impregnação em paraplast derretido a 60 °C em banho maria durante 30 minutos por duas vezes. Por fim, foi feita a inclusão final, colocando os fragmentos cuidadosamente no fundo de formas de silicone e acrescentando novamente o paraplast derretido em banho maria. Ao final do procedimento, os blocos foram polimerizados em temperatura ambiente por 48 horas. Então, as amostras foram levadas à microtomia.

5.3.3. Microtomia e coloração

Após a inclusão, as amostras foram seccionadas (3 µm de espessura para tecidos incluídos em GMA e 5 µm de espessura para tecidos incluídos em paraplast) com auxílio de uma navalha (navalha de vidro para blocos de GMA e navalha de alumínio para blocos de

Paraplast) em micrótomo (Leica RM2155) e distendidas em banho histológico MJ-72 (Metalúrgica OMA Ltda., São Paulo, SP) à temperatura ambiente por 2 minutos. Os cortes foram obtidos com uma diferença de 300 µm entre um e outro para evitar a repetição de granulomas teciduais e garantir a análise de diferentes granulomas. Em seguida, os cortes foram colocados em lâminas histológicas de vidro e fixados a 60 °C em placa aquecedora (Fischer Scientific Company) por 2 minutos.

5.3.3.1. Coloração em Hematoxilina-Eosina (HE)

Para visualização dos granulomas, infiltrados inflamatórios e eosinófilos teciduais, alguns cortes histológicos foram corados com HE (Sigma-Aldrich) nos tecidos incluídos em GMA, seguindo o protocolo descrito abaixo:

- a) Solução mordente de alúmen de ferro (Sigma-Aldrich) a 2% por 10 minutos;
- b) Água corrente por 5 minutos;
- c) Hematoxilina de Harris por 5 minutos;
- d) Água corrente por 10 minutos;
- e) Diferenciação em álcool acidulado por cerca de 1 minuto;
- f) Água corrente por 1 minuto;
- g) Eosina aquosa por 30 segundos;
- h) Água corrente por 5 minutos;
- i) Secagem a temperatura ambiente;
- j) Montagem da lâmina com Entellan[®] novo (Merck Milipore Corporation, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

A coloração foi realizada com auxílio de suporte de lâminas, pingando-se as soluções até que cobrissem os cortes por inteiro.

5.3.3.2. Coloração em Fast Green-Neutral Red

Para visualização dos granulomas e eosinófilos teciduais, alguns cortes histológicos foram corados com Fast Green-Neutral Red nos tecidos incluídos em GMA, seguindo o protocolo descrito abaixo:

- a) Diluir o corante Fast Green FCF (Sigma-Aldrich) em água destilada até atingir a concentração de 0,2%;

- b) Diluir o corante Neutral Red (Sigma-Aldrich) em água destilada até atingir a concentração de 0,5%;
- c) Corar com Fast Green 0,2% por 20 minutos;
- d) Lavar em água corrente por 1 minuto;
- e) Corar com Neutral Red 0,5% por 5 minutos;
- f) Lavar em água corrente por 1 minuto;
- g) Secagem a temperatura ambiente;
- h) Montagem da lâmina com Entellan® novo.

A coloração foi realizada com auxílio de suporte de lâminas, pingando-se as soluções até que cobrissem os cortes por inteiro.

5.3.3.3. Coloração em Tricrômico de Gomori

Para visualização de fibras colágenas presentes em granulomas esquistossomóticos, alguns cortes histológicos foram corados com Tricrômico de Gomori nos tecidos incluídos em Paraplast, seguindo o protocolo descrito abaixo (GRUNET, 1978):

- a) Hematoxilina por 1 minuto;
- b) Lavar em água corrente por 10 minutos;
- c) Solução principal (Chromotrope 2R: 0,6 g; Fast Green FCF: 0,3 g; Ácido fosfotúngstico: 0,6 g; Ácido acético glacial: 1 mL; Água destilada: qsp100mL; pH: 3,4) por 1 minuto;
- d) Lavar em solução aquosa de ácido acético a 0,2%;
- e) Desidratar com álcool;
- f) Secagem a temperatura ambiente;
- g) Montagem da lâmina com Entellan® novo.

A coloração foi realizada com auxílio de suporte de lâminas, pingando-se as soluções até que cobrissem os cortes por inteiro.

5.4. Imunohistoquímica (IHQ) para MBP-1

Cortes parafinizados (3 µm de espessura) de fígado de camundongos *Swiss* controle e infectados (n=4 animais/grupo) foram submetidos ao ensaio de imunohistoquímica (IHQ) para verificação da deposição de MBP-1 de eosinófilos em granulomas esquistossomóticos. A IHQ foi realizada utilizando um sistema de detecção (Novolink™ Polymer Detection Kit, Leica

Biosystems, Wetzlar, Alemanha) e um anticorpo primário IgG2a monoclonal de rato anti-camundongo MBP-1 (clone 14.7.4, 5 µg/mL, Lee Laboratories, Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, EUA), cuja especificidade já foi validada em estudos anteriores (DENZLER *et al.*, 2000; DIAS *et al.*, 2018; MARIETTA *et al.*, 2004; OCHKUR *et al.*, 2007). O protocolo foi seguido conforme definido por TOSCANO *et al.*, (2023), com algumas alterações.

Para isso, pelo menos duas horas antes do início dos procedimentos, as lâminas foram aquecidas em estufa a 60 °C para facilitar o derretimento da parafina. Então, as lâminas foram submetidas a desparafinação em xilol por três vezes durante 10 minutos cada e reidratação dos cortes em séries decrescentes de soluções alcoólicas (álcool 100° por duas vezes, 95°, 80°) por sete minutos cada. Depois, as lâminas foram lavadas duas vezes em solução salina fosfato tamponado (PBS) 1X, pH 7,4 por cinco minutos e seguiu-se para a etapa de recuperação antigênica dos tecidos. Nesta etapa, as lâminas foram acrescidas de tampão citrato, pH 6,0, e levadas a uma panela de pressão elétrica, para aplicação de calor úmido e pressão nos tecidos, durante 8 minutos após o início da pressão. Ao final, as lâminas foram mantidas no tampão citrato em temperatura ambiente por 30 minutos para resfriamento progressivo e, posteriormente, lavadas duas vezes em PBS 1X por 5 minutos.

As lâminas foram secadas ao redor dos cortes e circundadas com caneta hidrofóbica para demarcação da região dos tecidos. Então, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com a aplicação de uma solução de peróxido de hidrogênio a 3-4% v/v (Novolink™), por 15 minutos, seguido de duas lavagens em PBS 1X por cinco minutos cada e realização do bloqueio de proteínas inespecíficas com a aplicação de uma solução de caseína a 0,4% diluída em PBS, com estabilizadores, surfatante, e 0,2% de Bronidox L como conservante (Novolink™) por 10 minutos. Finalizado os bloqueios, os tecidos foram incubados com o anticorpo primário diluído em solução diluidora de anticorpo (PBS-BSA 3%) *overnight* a 4 °C.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS 1X por cinco minutos cada lavagem e incubadas com anticorpo secundário (IgG de coelho anti-rato, < 10 µg/mL, em 10% v/v, de soro animal em solução salina tamponada com Tris e ProClin™ 950 a 0,1% – Novolink™) por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com uma solução de polímero *Novolink* (IgG anti-coelho poli-HRP, < 25 µg/mL, em 10% v/v, de soro animal em solução salina tamponada com Tris e ProClin™ 950 a 0,1% – Novolink™) por 15 minutos. Após duas novas lavagens em PBS 1X por cinco minutos cada, foi aplicada a solução de DAB (3,3' – diaminobenzidina a 1,74% p/v, numa solução estabilizadora – Novolink™) diluída em solução *Novolink DAB Substrate Buffer – Polymer* (solução tampão com ≤ 0,1% de peróxido de hidrogênio e conservante – Novolink™). As lâminas foram lavadas em água destilada por

cinco minutos e a contra coloração foi feita adicionando hematoxilina (Sigma-Aldrich) às lâminas por 30 segundos e lavando imediatamente em água corrente por cinco minutos. Por fim, as lâminas foram desidratadas em séries crescentes de soluções alcoólicas (álcool 70°, 95° e 100° por duas vezes) durante 5 minutos cada, seguido da etapa de diafanização em solução de xilol por duas vezes e montagem final das lâminas com Entellan® novo (Merck Milipore Corporation). Para o controle negativo, lâminas incubadas apenas com solução diluidora de anticorpo (solução de PBS-BSA 3%) e lâminas incubadas com APC rat IgG2a, κ isotype control (R35-95, BD Biosciences) foram utilizadas para verificar a especificidade da reação.

5.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

5.5.1. Processamento das amostras

Fragmentos do fígado de camundongos *Swiss* controle e infectados previamente preparados (BONJOUR *et al.*, 2022; DIAS *et al.*, 2018), de aproximadamente 5 mm³, foram fixados por 2 horas em solução fixadora Karnovsky modificado: paraformolaldeído (Sigma-Aldrich) a 1% + glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences – EMS, Hatfield, PA, EUA) a 1,25% + solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Então, os fragmentos foram seccionados em fragmentos menores com aproximadamente 1 mm de espessura e imersos novamente no mesmo fixador *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, os tecidos fixados foram lavados em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 a 4 °C por 2 vezes de 4 horas cada lavagem e permanecendo na mesma solução *overnight* a 4 °C. Depois, os tecidos foram pós-fixados em uma solução contendo tetróxido de ósmio (tetróxido de ósmio – EMS – a 1% + ferrocianeto de potássio – EMS – a 1,5% em solução tampão 0,1 M, pH 7,4) por duas horas em temperatura ambiente, seguido de uma lavagem em tampão maleato de sódio, 0,05 M, pH 5,2.

Depois disso, foi realizada uma etapa de pré-contraste em acetato de uranila (EMS) a 2% em tampão maleato de sódio 0,05 M, pH 6,0 por duas horas a temperatura ambiente e lavagem no mesmo tampão. Então, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de diferentes soluções alcoólicas (álcool 50°, 70°, 85° e 95° por duas vezes durante 20 minutos cada e 100° por duas vezes durante 30 minutos cada) e acetona (duas vezes durante 30 minutos cada), e posteriormente infiltradas e incluídas em uma sequência de óxido de propileno-Epon (resina Eponate 12; Ted Pella, Redding, CA, EUA). A polimerização da resina ocorreu em estufa a 60 °C por 16 horas.

5.5.2. Microtomia, coloração e leitura das micrografias eletrônicas

Cortes semifinos com cerca de 500 nm de espessura foram obtidos em micrótomo Leica RM2155 (Leica; Bannockburn, IL, EUA), corados com azul de toluidina-borato de sódio (azul de toluidina O – Sigma-Aldrich; tetraborato de sódio – EMS), lavados em água destilada e levados para observação em microscópio de luz. Depois, cortes ultrafinos de 60-80 nm foram obtidos com auxílio de uma navalha de diamante em ultramicrótomo Leica EM UC6 (Leica), baseado na localização dos granulomas esquistosomóticos e na orientação dos cortes semifinos. Os cortes foram, então, colocados em telas de cobre de 200 mesh (Pelco® 200 mesh copper grids Ted Pella, Inc., Redding, CA, EUA) e contrastados em citrato de chumbo (EMS) durante cinco minutos. As telas foram analisadas em MET a 80-120 kV (CM 10; Philips, ou Tecnai G2-20-ThermoFischer Scientific/FEI 2006, Eindhoven, Países Baixos), onde foram obtidas as imagens digitais e micrografias eletrônicas. Pelo menos três grades de cada amostra foram analisadas.

5.6. Análises de imagem

5.6.1. Whole Slide Imaging (WSI)

As lâminas montadas para as análises histopatológicas e IHQ foram escaneadas utilizando-se o escâner de lâminas *Pannoramic Scan 3D Histech* (3D Histech kft., Budapeste, Hungria), que permite uma resolução de 0,23 µm por píxel, acoplado a um computador (Fujitsu Technology Solutions GmbH, Munique, Alemanha). As áreas das secções foram analisadas usando o software *Pannoramic Viewer 1.15.2 SP2 RTM* (3D Histech kft.) que promove análises morfométricas detalhadas com quantificações precisas dos diferentes parâmetros histopatológicos relacionados à infecção por *S. mansoni* a partir da investigação de toda a extensão dos cortes histológicos, não se limitando apenas a determinados campos microscópicos (AMARAL *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2020).

5.6.2. Enumeração e classificação dos granulomas

Secções hepáticas coradas em HE, obtidas por WSI conforme mencionado acima, foram medidas e todos os granulomas (total n=442 em camundongos e n=142 em *N. squamipes*) foram delineados e identificados com um número. Foram considerados apenas aqueles que

apresentaram pelo menos um ovo de *S. mansoni* em seu interior. Os seguintes parâmetros morfométricos foram avaliados: (i) enumeração e classificação de cada granuloma por estágio evolutivo conforme detalhado na Figura 11; (ii) frequência de cada estágio evolutivo de granuloma; (iii) área individual de cada granuloma; e (iv) número total de células dentro de cada granuloma. Em paralelo, secções coradas com tricrômico de Gomori subjacentes às secções coradas em HE, foram analisadas para a visualização da deposição e organização de fibras colágeno, que auxilia na classificação dos granulomas (AMARAL *et al.*, 2017).

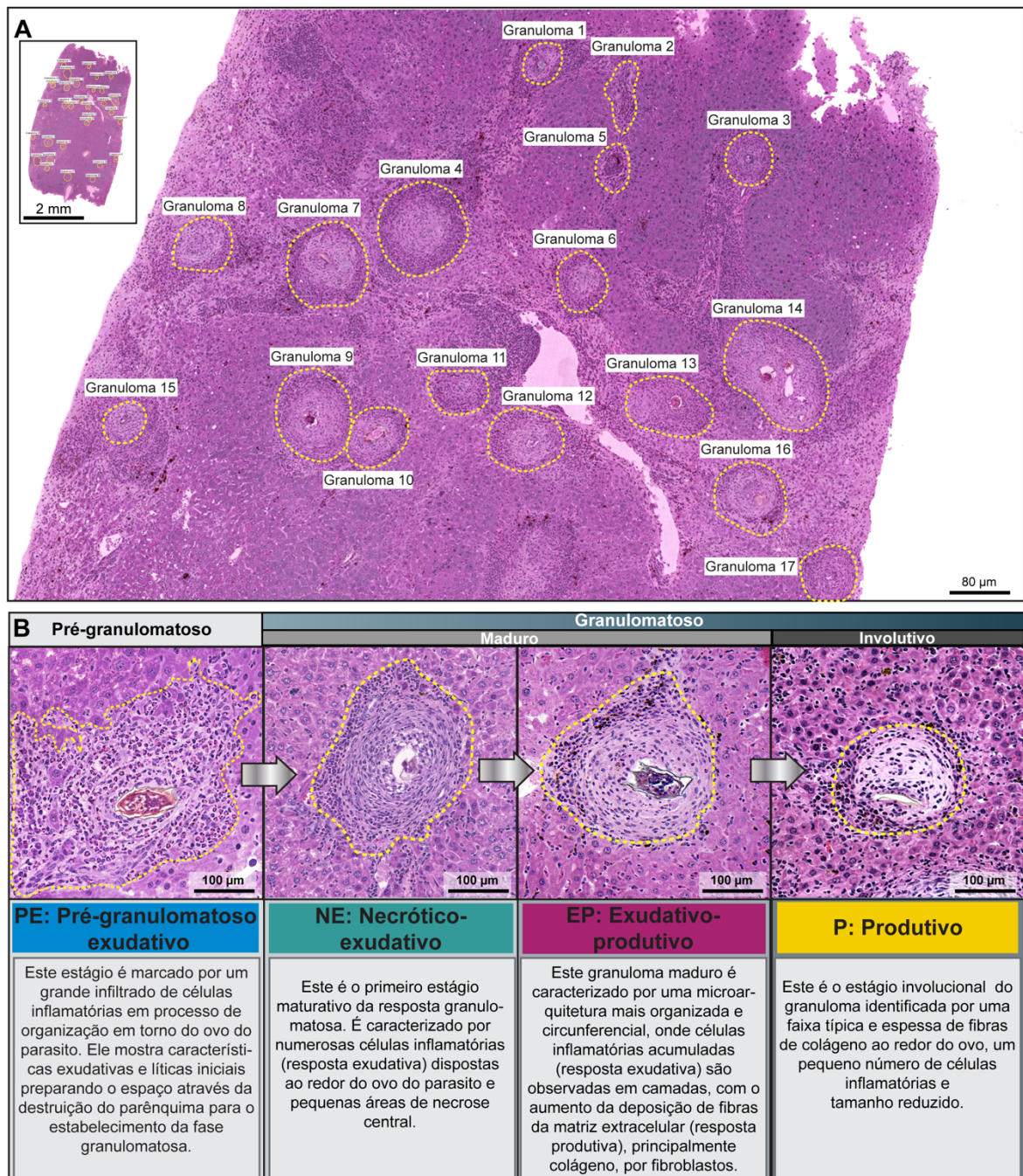


Figura 11. Distribuição e características histopatológicas da evolução de granulomas esquistossomóticos hepáticos. **(A)** Múltiplos granulomas (delineados) com diferentes tamanhos e em estágios evolutivos distintos são observados em um corte representativo de fígado infectado, corado em HE. **(B)** Descrição das principais características das fases pré-granulomatosa e granulomatosa.

5.6.3. Quantificação e distribuição de eosinófilos em granulomas

Para analisar o número de eosinófilos dentro de cada granuloma, imagens de alta resolução de granulomas individuais foram adquiridas por WSI. Os eosinófilos foram definidos baseado nas suas características histológicas típicas conforme descrito acima e foram manualmente anotadas. Os seguintes parâmetros foram avaliados para cada tipo de granuloma: (i) número total de eosinófilos e (ii) proporção de eosinófilos comparado ao número total de células. Adicionalmente, os números e distribuição (proporção) espacial de eosinófilos foram analisados dentro das três zonas distintas em cada granuloma: periovular, medial e periférica, cada um correspondendo a um terço ($1/3$) da área total do granuloma (FRANCISCO et al., 2022; LENZI et al., 1999). As zonas foram estabelecidas de acordo com a distância das linhas do eixo perpendicular do ovo do parasito até o limite do granuloma (Figura 12).

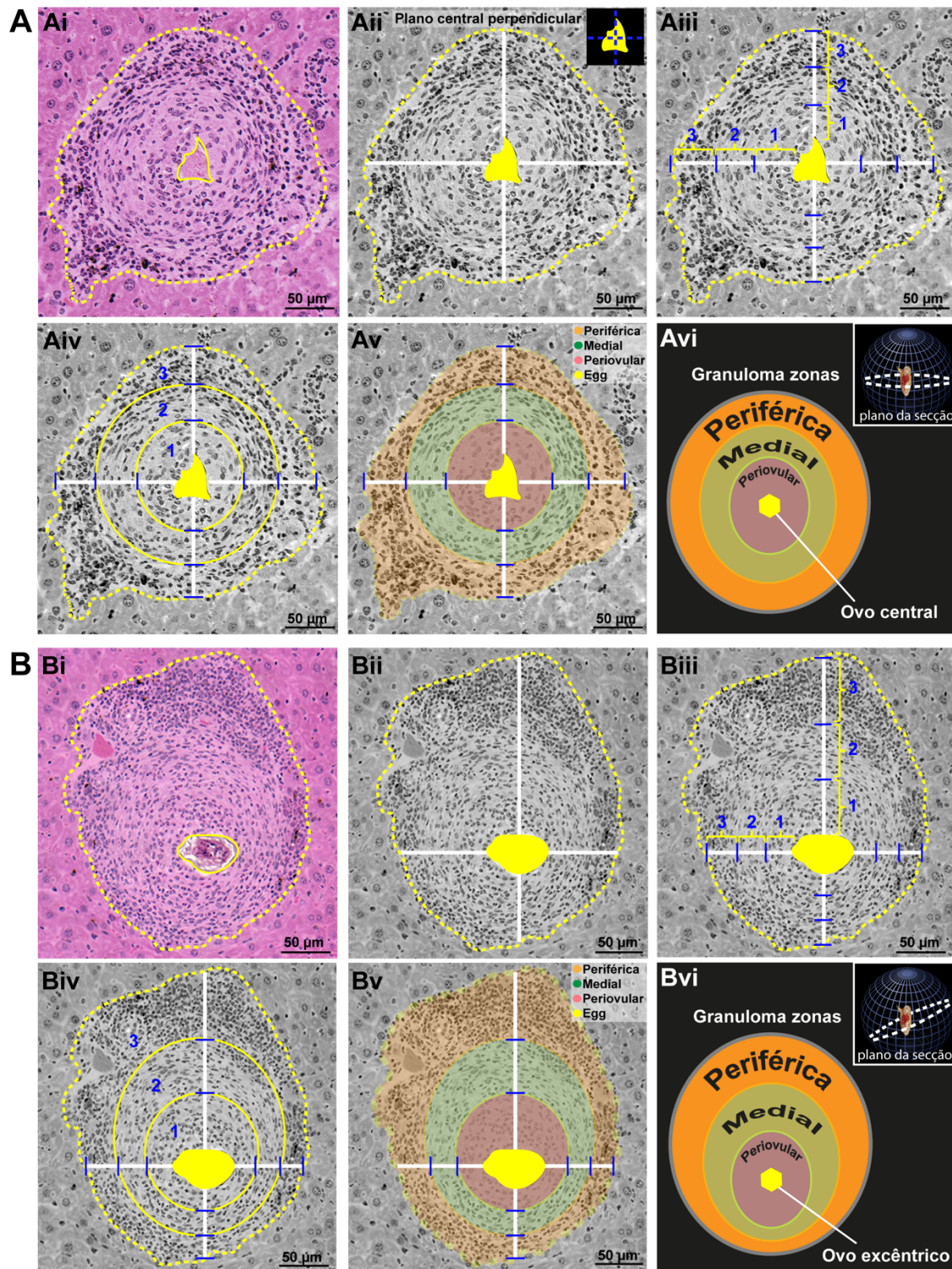


Figura 12. Delimitação digital das zonas espaciais de granulomas. **(A) ai-avi** Processo de zonação digital em um granuloma representativo com o ovo do parasito centralizado. **(B) bi-bvi** Processo de zonação digital em um granuloma representativo com o ovo do parasito excêntrico. Os granulomas foram delimitados **(ai, bi)** e as zonas delimitadas com um eixo central perpendicular ao ovo do parasito **(a ii, b ii)**. Então, as quatro linhas do eixo perpendicular, estabelecidas do ovo do parasito até os limites do granuloma, foram divididas em três partes de comprimentos iguais **(a iii, b iii)**. Este procedimento

estabeleceu três zonas circulares: periocular, medial e periférica (**aiv, biv**). Assim, estas zonas foram identificadas de forma confiável em granulomas com ovos centrais (**av, avi**) ou excêntricos (**bv, bvi**) e o número de eosinófilos foi quantificado em cada zona.

5.6.4. Análise quantitativa de IHQ

As lâminas foram digitalizadas com aumento de 20x utilizando o escâner de lâminas da 3D Hitech e analisadas a um aumento de 20x usando o software *Case Viewer* versão 2.3 (3D Hitech kft.). A área e a densidade ótica da imunomarcção de MBP-1 foram medidas através de uma análise morfométrica semiautomática com o software ImageJ versão 1.53e (National Institutes of Health – NIH, EUA). Foram avaliados a área total de 67 granulomas (16 PE, 18 NE e 33 EP), totalizando 5.588.043,9 μm^2 (PE: 1.117.509,8 μm^2 , NE: 1.792.830,3 μm^2 e EP: 2.677.703,8 μm^2). A máscara de hematoxilina/DAB foi selecionada e os pixels em coloração marrom de células marcadas com DAB foram automaticamente calibradas para criar uma imagem binária. O *threshold* de 0 a 132 pixels foi aplicado para calcular a área e a densidade ótica da imunomarcção.

5.6.5. Análise qualitativa e quantitativa de MET

Eletromicrografias apresentando eosinófilos infiltrados foram aleatoriamente adquiridas em aumentos diferentes (total de 786 micrografias) e um total de 94.771 μm^2 de área de tecido de granulomas hepáticos foi analisada. Para investigar a ultraestrutura de eosinófilos, todos os eosinófilos encontrados nas áreas de tecido foram contabilizados (n=275) e as células foram avaliadas pela maturidade, imaturidade e aspectos de secreção, além de suas interações célula-célula, conforme descrito por MELO; DVORAK; WELLER, (2022). O número de eosinófilos em interação física (apresentando contato célula-célula) com células imunes foi estabelecido. Todas as análises quantitativas foram executadas no software Fiji ImageJ (NIH).

5.6.6. Reconstrução tridimensional (3D) de secções seriadas de granulomas hepáticos

A metodologia de reconstrução 3D dos granulomas nos diferentes estágios evolutivos da doença foi realizada de acordo com protocolo descrito anteriormente (LIVINGSTON *et al.*, 2010), com alterações. A partir de fragmentos do fígado (0.5 cm^3) de animais infectados

experimentalmente (camundongos *Swiss*) e naturalmente (*N. squamipes*) por *S. mansoni*, incluídos em GMA, que foram processados histologicamente conforme descrito no item 5.3, foram obtidos centenas de cortes seriados (505 cortes para *Swiss* e 543 cortes para *N. squamipes*). Os cortes (3 μm de espessura) foram corados com HE e escaneados conforme descrito no item 5.3.3.1.

Granulomas representativos (um para cada estágio evolutivo) foram identificados e imagens seriadas bidimensionais (2D) em formato TIF foram capturadas para cada granuloma do mesmo animal, e foram alinhadas com o auxílio do software *Adobe Photoshop* (Adobe Inc., San Jose, CA, EUA). Eosinófilos infiltrantes nas diferentes regiões do granuloma foram identificados em camadas separadas das imagens seriadas que foram exportadas (formato PNG) e importadas sequencialmente ao software *Adobe After Effects* (Adobe Inc.) para composição das imagens 3D. Ao final, foram feitas animações a partir do uso de ferramentas de rotação do objeto nos três eixos espaciais, além de alterações da opacidade de camadas, posição e escala para uma visualização mais completa do tecido reconstruído e localização espacial dos eosinófilos.

5.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas e os gráficos gerados foram feitos com a utilização do software GraphPad Prism[®] versão 8.0.2 (San Diego, CA, EUA). O teste aplicado dependeu 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 $\leq 0,05$. Com isso, para comparação entre duas médias, o teste *t* de Student foi empregado quando estas atendiam aos pressupostos e o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi empregado quando as médias não atendiam aos pressupostos. Para comparações entre três médias ou mais, o teste *one-way* ou *two-way* ANOVA foi empregado, seguido pelo teste de Tukey, quando os dados atendiam aos pressupostos e o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn, quando os dados não atendiam aos pressupostos. Os dados foram analisados em testes de médias em todas as comparações e foram representados como média \pm erro padrão a menos que especificado de outra forma. Os dados nos gráficos de barra estão representados como média \pm erro padrão. Os dados nos gráficos de box plot estão representados como valores de mínimo ao máximo e mediana.

6. RESULTADOS

6.1. O granuloma esquistossomótico é um sistema evolutivo dinâmico

Para melhor caracterizar o processo de formação de granulomas ocorrendo na esquistossomose hepática, uma grande área de tecido hepático (total de 1.368 mm²) de camundongos *Swiss Webster* (n=6/grupo) experimentalmente infectados com *S. mansoni*, um modelo animal de esquistossomose bem estabelecido, foi microscopicamente examinada (AMARAL et al., 2017; DIAS et al., 2018; MIRANDA et al., 2013). As amostras foram coletadas aos 55 dias após a infecção, correspondente à fase aguda completamente desenvolvida, caracterizada pela secreção acentuada de SEAs e uma resposta Th2, e aos 120 dias após a infecção, correspondente à fase crônica, com a contínua deposição de ovos do parasito (AMARAL et al., 2017; BOROJEVIC, 1992; DIAS et al., 2018).

Para estudar a histopatologia hepática em maiores detalhes, uma abordagem histológica que combina a fixação e processamento otimizado com a inclusão em uma resina plástica (GMA), que fornece uma melhor resolução do tecido, em comparação a inclusão tradicional em parafina, com uma visualização otimizada dos processos inflamatórios (DIAS et al., 2018). No total, nove secções por animal foram coletadas. Das nove secções, três foram feitas de forma seriada e corada com três corantes diferentes (HE, tricrômico de Gomori e Fast Green-Neutral Red) para facilitar a identificação de aspectos morfológicos teciduais e celulares (Figura 13A).

Então, um intervalo de 300 µm foi mantido entre os grupos de três secções para aprofundar o órgão e evitar análises do mesmo granuloma (DIAS et al., 2018). Todas as secções foram analisadas por *Whole Slide Imaging* (WSI) (Figura 13A). A técnica de WSI permite a digitalização de secções inteiras com o uso de um escâner de lâminas digital, gerando imagens de microscopia em alta resolução e campo amplo com informações detalhadas sobre a microarquitetura do tecido (Figura 13A) (MELO et al., 2020).

O WSI revelou a formação dramática e extensiva de granulomas em todo o parênquima hepático em ambas infecções, aguda e crônica (Figura 13B e Figura 11). Primeiro, para quantificar os granulomas, todas as secções coradas em HE foram analisadas e todos os granulomas com pelo menos um ovo do parasito em seu interior (n total=442 granulomas; 151 da infecção aguda e 291 da infecção crônica) foram delineados (Figura 13B, bi-bvi). Depois, baseado nas características histopatológicas (AMARAL et al., 2017; LENZI et al., 1998), todos

os granulomas foram classificados de acordo com o seu estágio evolutivo (Figura 13C), conforme detalhado na Figura 11.

De acordo com pesquisas anteriores, o processo de formação dos granulomas envolve uma fase pré-granulomatosa e uma fase granulomatosa (AMARAL et al., 2017; LENZI et al., 1998). A fase pré-granulomatosa (denominado estágio pré-granulomatoso-exudativo; PE) é caracterizada por uma coleção desordenada de células ao redor do ovo do parasito, que progride a uma montagem altamente organizada de células (fase granulomatosa) e fibras da matriz extracelular (MEC; Figura 13C e Figura 11). Uma vez estabelecida, os granulomas esquistossomóticos tendem a ser mais esféricos e compactos, evoluindo de um estado maduro para um estado involucional (Figura 13C e Figura 11). Assim, mimetizando a doença humana, o modelo murino de infecção por *S. mansoni* desenvolveu múltiplos granulomas vistos em diferentes estágios evolutivos lado a lado na mesma secção tecidual (Figura 13C e Figura 11).

De maneira geral, nas infecções aguda e crônica, o estágio inicial (PE) foi encontrado em uma proporção menor em comparação aos outros estágios (Figura 13D). As duas formas maduras de granulomas (denominadas necrótico-exudativo; NE e exudativo-produtivo; EP – Figura 11) foram os tipos mais frequentes de granulomas encontrados no parênquima hepático nas duas fases de infecção (Figura 13D), enquanto que a forma involutiva de granulomas hepáticos (denominado produtivo; P – Figura 11) foi observada apenas na fase crônica da infecção (Figura 13D). Sendo assim, durante seu ciclo de vida, o granuloma esquistossomótico sofre uma involução gradual, reduzindo seu tamanho de acordo com a progressão da doença.

Além disso, o número total de células e a deposição de fibras de MEC dentro dos granulomas foi avaliado. As análises quantitativas de 142.246 células (71.964 células de 151 granulomas agudos e 70.282 células de 291 granulomas crônicos) mostrou que o número total de células diminui gradativamente junto com a maturação do granuloma (Figura 13F e ANEXO 1 – Tabela 1). Em paralelo, ocorre um aumento na acumulação e compactação de fibras de MEC, principalmente fibras colágenas, que é um indicativo do estabelecimento de fibrose, como observado em todas as secções coradas em Gomori, que destacam as fibras colágenas em verde (Figura 13C).

Em consonância com nosso ponto de vista proposto anteriormente de que os granulomas esquistossomóticos são um ecossistema em evolução (MALTA et al., 2021), confirmamos que a natureza fundamental dos granulomas depende de uma perspectiva evolutiva que abrange mudanças graduais em sua microestrutura.

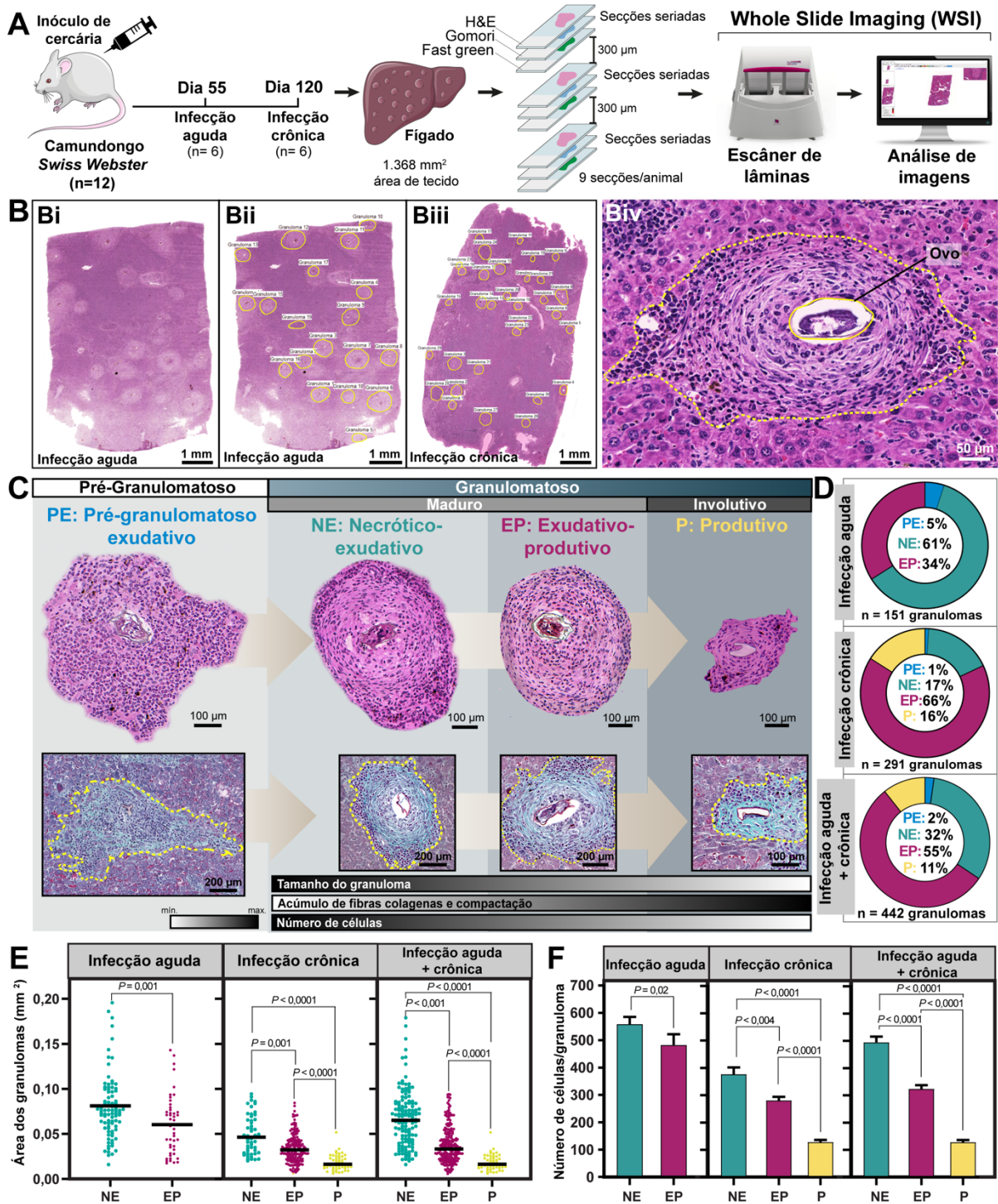


Figura 13. O granuloma esquistossomótico é um sistema evolutivo dinâmico. (A) Desenho experimental para avaliar a histopatologia dos granulomas hepáticos de camundongos durante a infecção aguda e crônica causada pelo parasito *S. mansoni* (n=6 camundongos/grupo), infectados com um único inóculo de 100 cercárias, cepa LE. Nove secções foram obtidas por animal. Três secções seriadas foram coradas com três diferentes colorações citológicas [hematoxilina e eosina (HE); tricrômico de Gomori e fast green-neutral red] e digitalizadas através do escâner de lâminas. Foi mantido um intervalo de 300 mm entre grupos de três secções para aprofundamento da amostra, a fim de evitar a análise de um mesmo

granuloma. **(B) bi-biv** Em imagens escaneadas em alta resolução de secções inteiras de fígado, todos os granulomas (n total= 442, 151 da fase aguda e 291 da fase crônica), foram delineados, enumerados e classificados por estágio evolutivo. **(C, D)** Fases pré-granulomatosa e granulomatosa e seus respectivos estágios evolutivos (tipos e proporções). Os granulomas são visualizados com HE e também com Gomori, que destaca as fibras da matriz extracelular (MEC), principalmente as fibras colágenas, em verde. Observa-se a acumulação progressiva das fibras colágenas. **(E, F)** O tamanho dos granulomas e seu número total de células reduziram significativamente ao longo da evolução do granuloma. A área do granuloma (mm^2) foi determinada para granulomas individuais. Pontos dispersos em **(E)** representam o dado de um único granuloma. Um total de 142.246 células (71.964 da infecção aguda e 70.282 da infecção crônica) foram quantificadas e o número médio de células foi estabelecido por tipo de granuloma. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. O valor de *P* indica o resultado dos testes estatísticos Mann-Whitney seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações (infecção aguda) ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações (crônica e aguda + infecção crônica).

6.2. Eosinófilos são organizados espacialmente e ocupam um sítio preferencial dentro de granulomas esquistossomóticos

Os ovos do parasito confinados no fígado atraem uma população substancial de eosinófilos que colonizam o tecido hepático para formar granulomas juntamente com outras células imunes e residentes (COLLEY; SECOR, 2014). Eosinófilos infiltrantes foram avaliados por WSI (n=9 secções/animal) e MET (Figura 14A). No escaneamento de granulomas (n=442) por WSI, os eosinófilos foram identificados inequivocadamente a partir de seus núcleos segmentados e pela natureza acidofílica típica de seus grânulos secretores citoplasmáticos (grânulos específicos), que aparecem em cor roseada (Figura 14B, bi-bii) ou verde (Figura 14C, ci-cii), quando corados com HE ou fast green-neutral red, respectivamente.

A presença acumulada de eosinófilos também foi confirmada com MET, que revelou a ultraestrutura única dos grânulos de eosinófilos com um cristalóide cristalino elétron-denso e uma matriz externa elétron-lúcida (Figura 14D) (MELO; DVORAK; WELLER, 2022). Um total de 45.125 eosinófilos (ANEXO 1 – Tabela 1) foram quantificados e a proporção destas células por estágio de granuloma foi determinada em comparação ao número total de células (total n=142.246 células; Figura 14E).

O estágio pré-granulomatoso (PE), ou seja, sítios teciduais onde células imunes estão se acumulando e em processo de organização em granulomas (Figura 13C e Figura 11B), apresentou mais de 50% do seu número total de células compostas apenas de eosinófilos (Figura

14E). Entretanto, após o estabelecimento do granuloma em infecções agudas e crônicas, a proporção de eosinófilos foi menor em comparação ao estágio PE e permaneceu estável em relação a toda comunidade celular (variação de 27-30% de todas as células no granuloma) em todos os tipos de granuloma (Figura 14E). Análises quantitativas mostraram que o número total de eosinófilos (n=45.125 eosinófilos) reduziu significativamente de acordo com a progressão da doença (Figura 14F e ANEXO 1 – Tabela 1).

Notavelmente, uma vez dentro do granuloma maduro, os eosinófilos não irregularmente dispersos como visto na fase pré-granulomatosa (PE; Figura 13C e Figura 11B), mas dispostos principalmente em camadas (Figura 14B, C). Isso sugere fortemente que, após o recrutamento e a acumulação (estágio PE), os eosinófilos são capazes de se organizar dentro de granulomas maduros de uma maneira que otimiza a eficácia da vida do granuloma.

Para obter uma compreensão mais profunda sobre como a população de eosinófilos foi organizada dentro dos diferentes tipos de granuloma, a distribuição espacial dos eosinófilos foi investigada em maiores detalhes. Com base na localização do ovo do parasito, três zonas espaciais de granuloma – periovular, medial e periférica (Figura 14G, gi-gii) – (LENZI et al., 1999) foram estabelecidas digitalmente, conforme detalhado no item **5.6.3**, e o número de eosinófilos foi quantificado em cada zona. Nossa estratégia de anotação digital para a zonação dos granulomas foi útil para fornecer medições de zona consistentes, mesmo quando o plano de corte mostrou granulomas com ovos excêntricos (Figura 12).

A investigação de granulomas individuais zoneados (n=424) revelou que os eosinófilos predominaram a zona periférica de todos os estágios evolutivos de granulomas (NE, EP e P) com pelo menos 80% dos granulomas apresentando maior número de eosinófilos nesta região em comparação com as outras zonas (Figura 14H). Consideravelmente, as análises quantitativas demonstraram uma proporção maior de eosinófilos na zona periférica independentemente do tipo de granuloma e do tempo de infecção (Figura 14I-K).

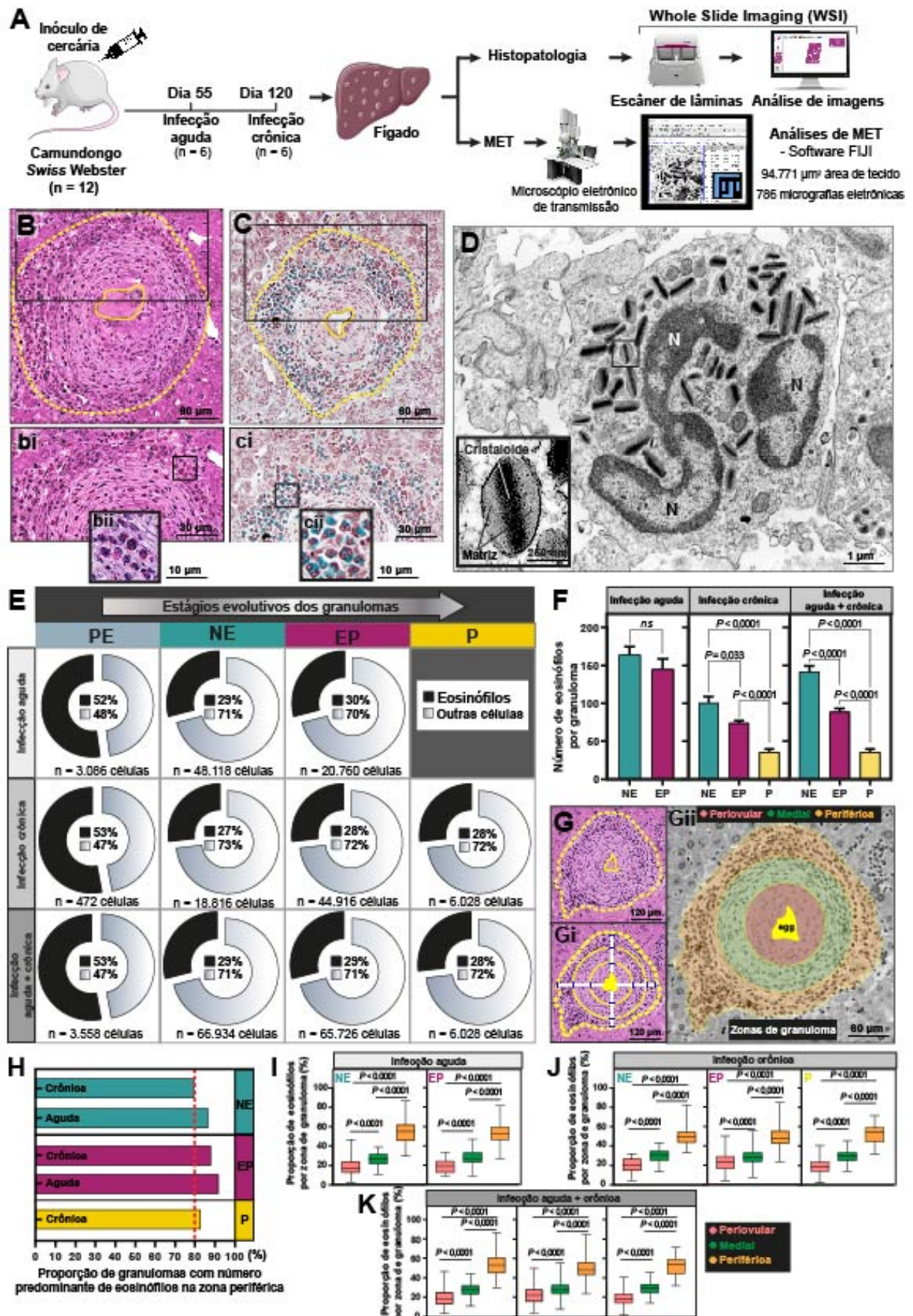


Figura 14. Eosinófilos infiltrantes estão espacialmente organizados e ocupam um sítio preferencial dentro de granulomas. (A) Desenho experimental para investigar o número e a distribuição de

eosinófilos em granulomas hepáticos formados em camundongos na infecção aguda e crônica por *S. mansoni* (n=6 camundongos/grupo). Eosinófilos foram avaliados por WSI (n=9 secções/animal) e microscopia eletrônica de transmissão (MET; 94.771 mm² de área de tecido). **(B, C)** Granulomas representativos mostram eosinófilos organizados em camadas e identificados por seu núcleo segmentado e o citoplasma acidófilo corado em rosa (HE) ou verde (fast green-neutral red), respectivamente. As áreas destacadas em **(B)** e **(C)** estão representadas em maior aumento em **bi/bii** e **ci/cii**. **(D)** Eletromicrografia representativa apresenta a ultraestrutura única de eosinófilos. Grânulos secretores (visto em maior aumento na área destacada) apresentam um cristalóide central elétron-denso e uma matriz externa elétron-lúcida. N, núcleo. **(E)** Proporção de eosinófilos nos estágios evolutivos de granulomas. O número total de células/tipo de granuloma está indicado. **(F)** O número de eosinófilos/tipo de granuloma diminui significativamente junto a maturação do granuloma. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. O valor de *P* indica o resultado dos testes estatísticos Mann-Whitney seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações (infecção aguda) ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações (crônica e aguda + infecção crônica). ns, não significativo. **(G) gi, gii** Representação esquemática das três zonas espaciais (periovular, medial e periférica) em um granuloma representativo. **(H)** Pelo menos 80% de todos os granulomas (n total=442) exibiram a maioria dos eosinófilos na sua zona periférica. **(I-K)** O número de eosinófilos é significativamente maior nas zonas periféricas de granulomas comparado às zonas medial e periovular. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. O valor de *P* indica o resultado dos testes estatísticos Mann-Whitney seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações [infecção aguda (NE, EP) + infecção crônica (NE, P)] ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações [infecção crônica (EP) + infecção crônica + aguda (NE, EP)].

A função clássica de eosinófilos está baseada em sua resposta efetora associada à liberação do conteúdo pré-formado de produtos armazenados em seus grânulos, incluindo a Proteína Básica Principal (MBP; *Major Basic Protein*)-1 (MELO *et al.*, 2009), uma proteína catiônica eosinofílica abundante (ACHARYA; ACKERMAN, 2014). A MBP é reconhecida como um marcador clássico para a localização e desgranulação de eosinófilos (MELO *et al.*, 2009). Quando liberada, a MBP resulta em citotoxicidade para uma variedade de tecidos (ACHARYA; ACKERMAN, 2014; PONIKAU *et al.*, 2005) e é considerada uma helmintotoxina *in vitro* contra larvas de *S. mansoni* (ACKERMAN *et al.*, 1985; BUTTERWORTH *et al.*, 1979).

Em seguida, a distribuição espacial de MBP-1 dentro de granulomas evolutivos provocados pela infecção experimental aguda e crônica em camundongos foi interrogada (Figura 15A). O escaneamento em alta resolução de secções do fígado mostraram uma

marcação de MBP-1 robusta e bem definida espacialmente em todos os tipos de granuloma (Figura 15B). Nossa abordagem de zonagem aplicada a granulomas individuais demonstrou uma alta concentração de MBP-1 na zona periférica do granuloma, com marcações nos ovos do parasito negativos ou insignificantes para esta proteína (Figura 15C, D).

Além disso, análises quantitativas de imagem revelaram que 73-91% de todos os granulomas (n=67 granulomas) tinham imunomarcação de MBP-1 predominantemente localizada na zona periférica (Figura 15E). Assim, a IHQ para MBP-1 confirmou a localização espacial preferencial de eosinófilos na zona periférica de todos os estágios evolutivos de granulomas esquistossomóticos (Figura 14B, C).

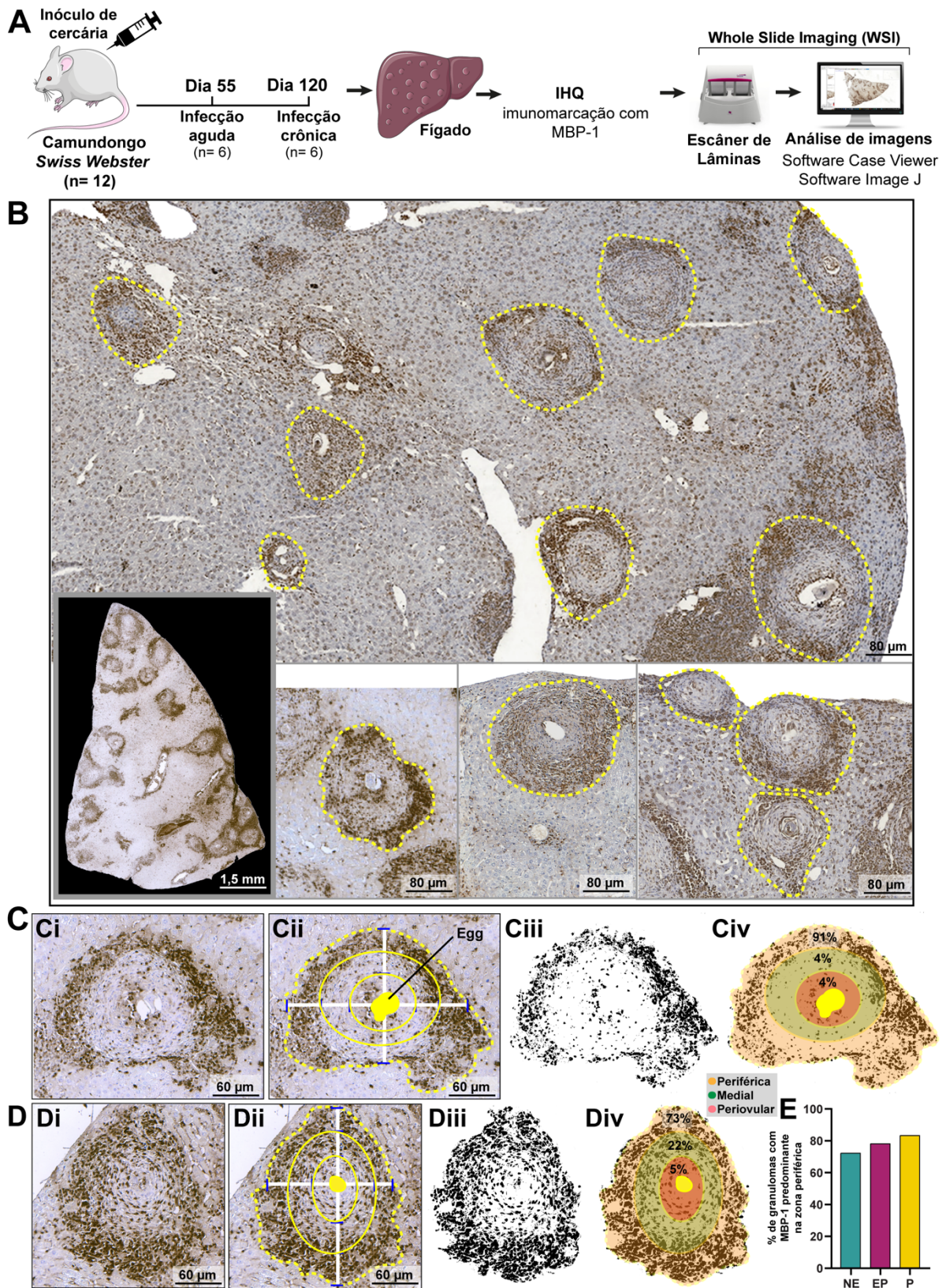


Figura 15. A marcação de MBP-1 é altamente concentrada na zona periférica dos granulomas esquistossomóticos hepáticos. **(A)** Desenho experimental para investigar a imunomarcção de Proteína Básica Principal (MBP)-1 nos granulomas hepáticos formados durante a infecção experimental aguda e crônica pelo parasito *S. mansoni* (n=4 animais por grupo). Secções de fígado (n=5/animal) foram

processadas para a imunohistoquímica (IHQ) utilizando o anticorpo anti-MBP-1 monoclonal e digitalizadas no escâner de lâminas. Granulomas (n=67) foram delineados e enumerados, e a intensidade da imunomarcação foi avaliada para a determinação da área de imunomarcação (%). **(B)** Secções representativas do fígado escaneadas em alta resolução após a imunomarcação por MBP-1 revelaram alta concentração de MBP-1, identificados pelo precipitado marrom, na zona periférica em todos os estágios evolutivos dos granulomas. **(C, D)** Procedimento de zonação digital aplicado à granulomas representativos para a avaliação da área da imunomarcação de MBP-1 (%) por zona de granuloma. Um intervalo de 73-91% de toda a área imunomarcada foi localizado na zona periférica dos granulomas. Imagens binárias de granulomas são mostradas em **ciii** e **diii**. **(E)** Análises quantitativas detectaram a predominância da marcação de MBP-1 na zona periférica em todos os estágios evolutivos de granulomas.

6.3. Eosinófilos estabelecem interação direta com outras células imunes na zona periférica de granulomas esquistossomóticos

Para identificar as características ultraestruturais relevantes dos eosinófilos presentes no microambiente granulomatoso, um estudo abrangente usando MET foi realizado. A MET captura de forma única o comportamento celular em alta resolução em seu contexto tecidual e é particularmente elucidativa na demonstração das intrincadas e variadas atividades secretoras de eosinófilos (MELO; DVORAK; WELLER, 2022). Um total de 786 micrografias eletrônicas das infecções aguda e crônica foram analisadas, correspondendo a uma área total de 94.771 mm² (Figura 16A), e revelaram que eosinófilos estavam intimamente organizados em aglomerados na zona periférica (Figura 16B), conectado a outras células imunes por meio de contatos célula-célula (Figura 16C-E).

Foram identificadas interações físicas entre eosinófilos e neutrófilos (Figura 16D, E), linfócitos (Figura 16D), macrófagos (Figura 16E) e plasmócitos (Figura 16E). Essas interações foram frequentemente vistas como projeções estreitas (*tethers*) e/ou pequenas áreas com aumento de espessura nas interfaces das membranas plasmáticas (Figura 16C, ci). Dos 275 eosinófilos, 198 (72%) estavam em contato célula-célula com uma ou mais células imunes (Figura 16F). Interessantemente, as análises revelaram que não apenas eosinófilos maduros (Figura 14D, Figura 16B-D), mas também eosinófilos com sinais de imaturidade, tais como a presença de grânulos citoplasmáticos sem cristalóide (grânulos específicos imaturos) e grandes quantidades de cisternas de retículo endoplasmático (RE) (MELO; DVORAK; WELLER,

2022; MELO; WELLER, 2018) estavam presentes na zona periférica de granulomas esquistossomóticos (Figura 16E, ei).

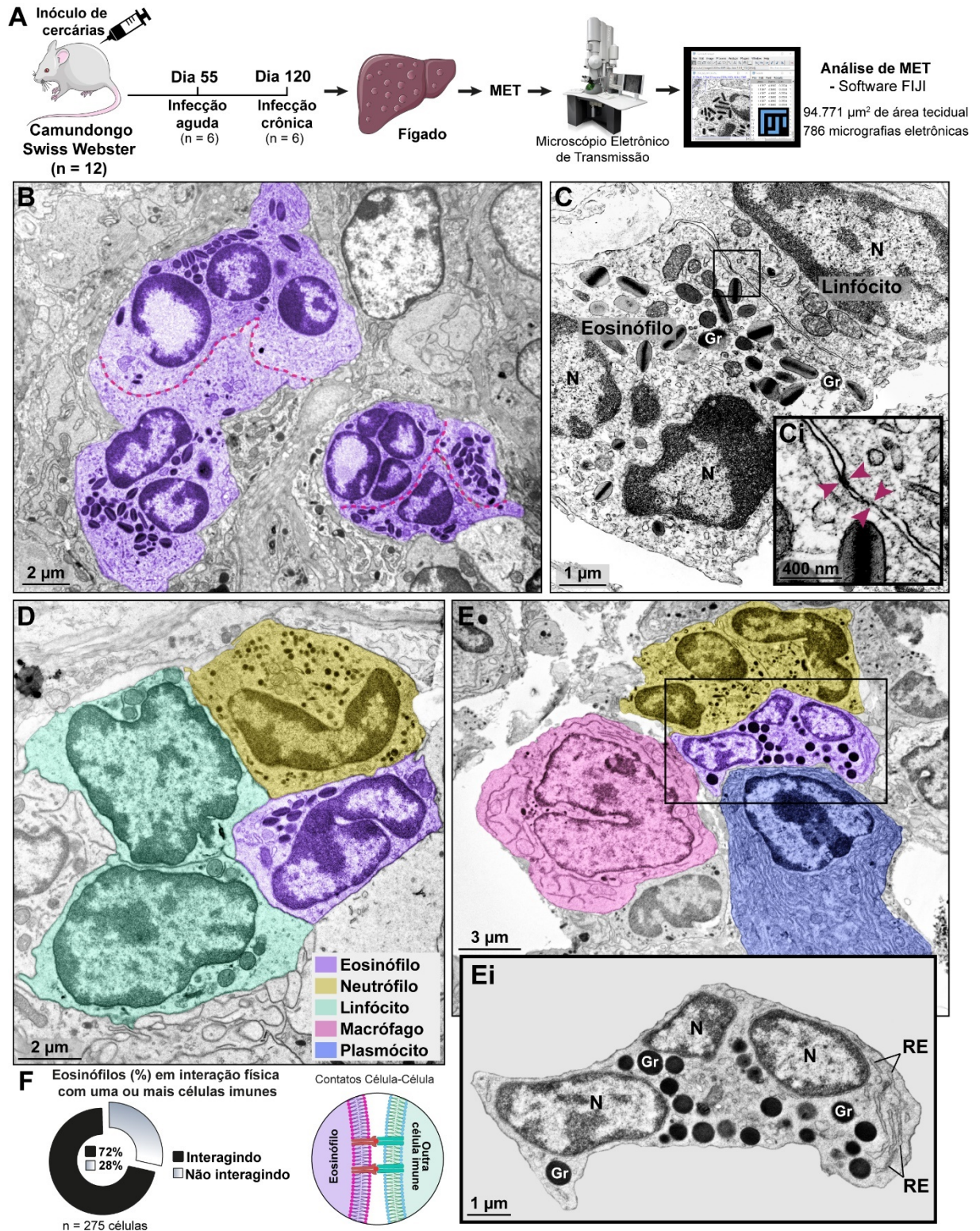


Figura 16. Eosinófilos estabelecem interação direta com outras células imunes na periferia dos granulomas esquistossomóticos. **(A)** Desenho experimental para investigação ultraestrutural de

eosinófilos no microambiente granulomatoso. Granulomas hepáticos de infecções aguda e crônica foram processados para microscopia eletrônica de transmissão (MET), e 786 eletromicrografias, obtidas da zona periférica do granuloma (correspondente a 94.771 mm² da área do granuloma), foram analisadas no software FIJI. Todos os eosinófilos intactos (n=275) foram contabilizados e examinados individualmente em alta resolução. **(B)** Conjunto de eosinófilo apresentam interação célula-célula. Linhas vermelhas delimitam a membrana plasmática entre as células em interação. **(C)** Interação eosinófilo-linfócito. A área destacada em **(C)** é mostrada em maior aumento em **ci**. Cabeças de seta indicam áreas de contato célula-célula. **(D, E)** Contato célula-célula entre eosinófilos e outras células imunes. **(E) ei** A área destacada em **(E)** mostra, em maior aumento, eosinófilos com maturação incompleta, com ausência de cristalóide nos grânulos e com grande quantidade de filamentos de retículo endoplasmático (RE). **(F)** A maioria dos eosinófilos (72%) estão em interação direta com uma ou mais células imunes. N, núcleo; Gr, grânulo secretor.

Em seguida, avaliamos a ocorrência de alterações ultraestruturais associadas à secreção de eosinófilos, um processo comumente conhecido como desgranulação (MELO; DVORAK; WELLER, 2022; MELO; WELLER, 2018). Análises de imagem de eosinófilos (n=275) revelaram um padrão morfológico prevalente consistente com desgranulação por *piecemeal* (PMD – *piecemeal degranulation*), um mecanismo frequente de secreção de eosinófilos *in vivo* durante doenças associadas a eosinófilos (EADs; Figura 17) (MELO; WELLER, 2010). Esses resultados são consistentes com nosso trabalho prévio na fase aguda da esquistossomose em camundongos (DIAS *et al.*, 2018). PMD é um processo de secreção mediado por vesículas que reflete a habilidade de eosinófilos em liberar diferencialmente pequenas quantidades de proteínas derivadas dos grânulos, incluindo citocinas e MBP-1 (MELO *et al.*, 2013; MELO; DVORAK; WELLER, 2022; MELO; WELLER, 2010, 2018).

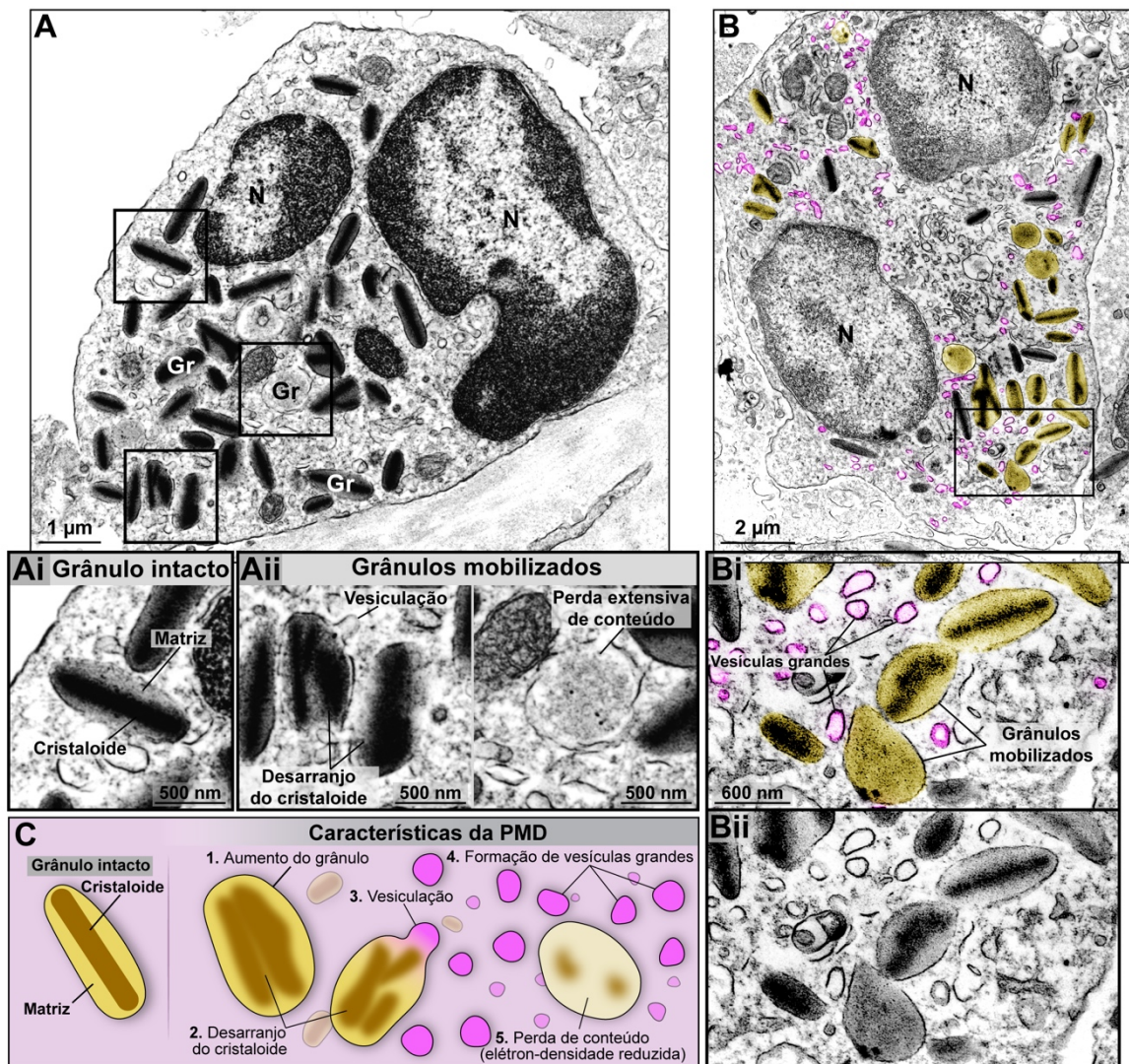


Figura 17. Eosinófilos secretam seu conteúdo granular por desgranulação por piecemeal (PMD) em granulomas esquistossomóticos. **(A, B)** Características ultraestruturais de PMD foram consistentemente encontradas no citoplasma de eosinófilos especialmente localizados na periferia dos granulomas. **ai, aii, bi, bii** Área delimitada em **(A)** e **(B)** mostram, em maior aumento, grânulos intactos e mobilizados (ativados) com características de PMD, incluindo dilatação de grânulo, desarranjo de cristalóide, liberação de conteúdo e formação de vesículas grandes (80-150 nm). **(C)** Representação esquemática da comparação de grânulos intactos com grânulos exibindo características de PMD. N, núcleo; Gr, grânulo secretor. Um total de 786 eletromicrografias da infecção aguda e crônica por *S. mansoni* em camundongos foram analisadas.

Em conjunto, os achados de MET identificam que, na zona periférica do granuloma, os eosinófilos se organizam, estabelecem interações estreitas com outras células imunes e secretam seu conteúdo granular por meio de PMD, sugerindo assim que essas células podem

desempenhar um papel imunorregulador, em vez de estarem diretamente envolvidas na destruição dos ovos do parasito.

6.4. A localização espacial de eosinófilos em granulomas esquistossomóticos é conservada na infecção natural

A partir da compartimentalização consistente de eosinófilos na zona periférica de granulomas na infecção experimental aguda e crônica, abriu-se o questionamento se o mesmo padrão ocorre em infecções naturais. Sendo assim, o fígado do roedor neotropical semiaquático *N. squamipes* (rato d'água) foi investigado (n=4 animais), após sua captura durante um longo estudo em áreas endêmicas de esquistossomose no Brasil (Figura 18A) (VARELLA *et al.*, 2024). O *N. squamipes* possui um papel crucial como reservatório silvestre para esquistossomose humana, perpetuando o ciclo de transmissão na natureza e servindo como um importante indicador biológico de locais de transmissão de *S. mansoni* devido a sua alta susceptibilidade de infecção (GENTILE *et al.*, 2006).

Com uma ampla distribuição geográfica, o *N. squamipes* é um dos principais hospedeiros definitivos não humanos do *S. mansoni* no Brasil, com parâmetros tradicionais de infecção bem caracterizados (carga parasitária e deposição de ovos consistentes, e desenvolvimento de respostas granulomatosas) (AMARAL *et al.*, 2017; GENTILE *et al.*, 2006). Secções teciduais (n=9/animal) foram preparadas e digitalizadas (WSI; Figura 18A) utilizando a mesma abordagem da infecção experimental (Figura 13A) e um total de 142 granulomas hepáticos correspondendo a 1.033 mm² de área de tecido foram analisados (Figura 18A e ANEXO 2 – Tabela 2).

A resposta inflamatória granulomatosa de *N. squamipes* infectados por *S. mansoni* manifestou lesões bem definidas no fígado, conforme reportado anteriormente (AMARAL *et al.*, 2017; COSTA-NETO *et al.*, 2013; COSTA-SILVA *et al.*, 2002). Foram encontrados os mesmos estágios evolutivos de granulomas (Figura 18B) como os observados na infecção experimental (Figura 13C), mas com uma prevalência maior de granulomas do tipo P (Figura 18C). Isso pode ser atribuído às múltiplas reinfecções experienciadas por esse roedor durante seu ciclo de vida, levando a uma subsequente imunidade adquirida e/ou a uma capacidade melhorada para lidar com a infecção (AMARAL *et al.*, 2017).

A presença de novos granulomas formados (PE e NE) informa que novos ovos do parasito continuam a alcançar o fígado, possivelmente devido a exposição repetida a cercárias

(forma infectante no hospedeiro definitivo), a qual é também um aspecto comum em humanos vivendo em regiões endêmicas para a esquistossomose (COLLEY et al., 2014). Granulomas tiveram uma acumulação progressiva de fibras de MEC e redução no número de células conforme os granulomas EP involuem para o estágio P (Figura 18B, D, E).

Em seguida, a população de eosinófilos em granulomas (Figura 18F, G) após coloração com HE (Figura 18F, fi) ou fast green-neutral red (Figura 18G, gi) foi avaliada. As análises revelaram o mesmo padrão de acumulação de eosinófilos vista no modelo experimental: inicialmente como uma coleção de células desordenadas na fase pré-granulomatosa (estágio PE; Figura 18B) e, subsequentemente, como uma população organizada em granulomas maduros (estágios NE e EP; Figura 18F, G). O número de eosinófilos reduziu significativamente junto a maturação e involução do granuloma (Figura 18H). A proporção de eosinófilos ($n=3.402$) em relação ao número total de células do granuloma ($n=15.395$) foi maior no estágio PE (31%) comparado aos outros estágios (intervalo de 11-22%; Figura 18I).

Depois, a distribuição espacial de eosinófilos em granulomas individuais ($n=142$) foi investigada aplicando o procedimento de zonação digital conforme detalhado na Figura 12. Os granulomas em todos os estágios evolutivos (80-100%) apresentaram o número de eosinófilos predominantemente na zona periférica (Figura 18K). Notavelmente, as análises quantitativas demonstraram um aumento significativo da proporção de eosinófilos na zona periférica em comparação às zonas medial e periovular, com uma menor proporção encontrada na região periovular (Figura 18L).

Com isso, os resultados encontrados sugerem que em granulomas esquistossomóticos hepáticos induzidos pela infecção natural, os eosinófilos apresentam uma “adaptação espacial”, permanecendo majoritariamente compartimentalizado na zona periférica dos granulomas, uma localização conservada, similar ao reproduzido na infecção experimental.

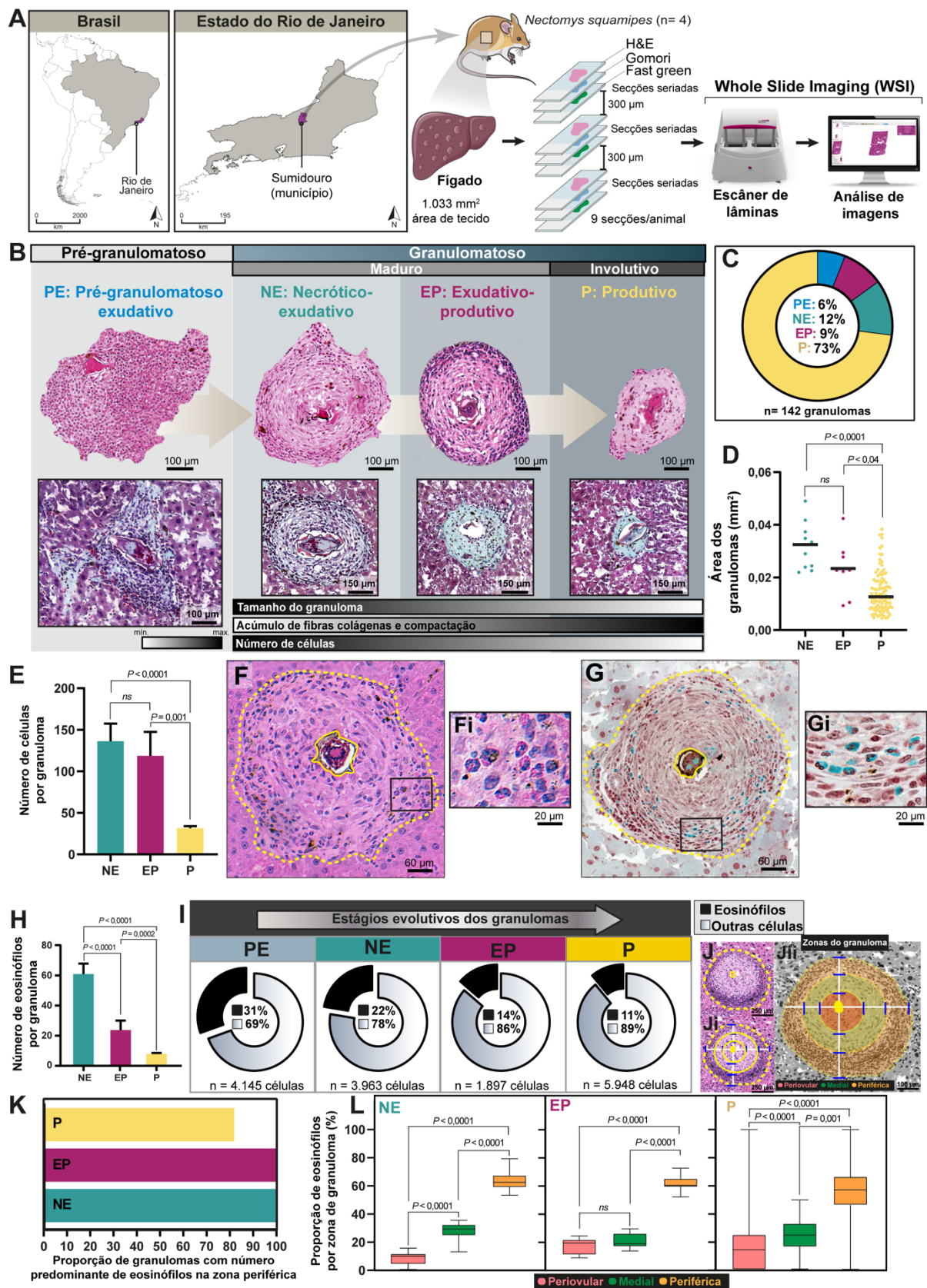


Figura 18. Eosinófilos apresentam adaptação espacial em granulomas formados durante a infecção natural por *S. mansoni*. (A) Desenho experimental para avaliar granulomas hepáticos do reservatório silvestre *N. squamipes* (n=4) capturados em uma área endêmica de esquistossomose no Brasil

(município de Sumidouro, RJ). Após a confirmação da infecção, fragmentos de fígado foram coletados para histopatologia (n=9 secções/animal) utilizando a mesma estratégia metodológica estabelecida para a infecção experimental em camundongos. Granulomas (n=142) foram delineados, enumerados e classificados por estágios evolutivos em imagens de alta resolução de secções de fígado inteiras. **(B, C)** Fases pré-granulomatosa e granulomatosa e seus respectivos estágios evolutivos (tipos e proporções) são observadas após a coloração citológica com HE e tricrômico de Gomori. A redução progressiva do tamanho dos granulomas e da acumulação de fibras de colágeno, coradas em verde, foram evidenciadas. **(D, E)** O tamanho dos granulomas (área) e o número total de células reduziram significativamente durante o desenvolvimento dos granulomas. A área do granuloma (mm²) foi determinada para granulomas individuais. Pontos dispersos em **(D)** representam o dado de um único granuloma. Um total de 15.395 células foi quantificado e o número médio de células foi estabelecido por tipo de granuloma. Os resultados são expressos em média ± erro padrão. O valor de *P* indica o resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. **(F, G)** Eosinófilos identificados em granulomas com seu citoplasma em cor rosa (HE) ou verde (fast green-neutral red). As áreas destacadas em **(F)** e **(G)** estão representadas em maior aumento em **fi** e **gi**. **(H)** Proporção de eosinófilos (n=3.402) em relação ao número total de células no granuloma (n=15.395). **(I)** Número de eosinófilos por tipo de granuloma expresso como média ± erro padrão. O valor de *P* indica o resultado do teste estatístico *one-way* ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey. **(J)** Granulomas representativos após o processo de zonação para quantificar eosinófilos nas zonas periovular, medial e periférica. **(K)** De 80-100% de todos os granulomas (n total=142) exibiram a maioria dos eosinófilos nas suas zonas periféricas. **(L)** O número de eosinófilos é significativamente maior na zona periférica de granulomas em comparação as zonas medial e periovular. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. O valor de *P* indica o resultado dos testes estatísticos Mann-Whitney seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações (NE, EP) ou Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações (P).

6.5. Eosinófilos ocupam um importante nicho ecológico em granulomas esquistossomóticos

Para reforçar a confirmação da organização espacial de eosinófilos em granulomas hepáticos induzidos pela infecção por *S. mansoni*, reconstruções histológicas quantitativas 3D de granulomas inteiros foram realizadas (Figura 19 e ANEXO 3 – Tabela 3). Um granuloma representativo de cada estágio evolutivo (PE, NE, EP e P) das infecções experimental e natural foi completamente seccionado, as imagens de cada secção seriada foram alinhadas e os eosinófilos foram mapeados em cada secção antes da reconstrução do granuloma (Figura 19A, B).

Com esta abordagem única, o volume de cada tipo de granuloma foi calculado (Figura 19C), e a presença acumulada de eosinófilos foi observada em todo o volume do granuloma, separada de todas as outras células e fibras de MEC (Figura 19D). Consistente com os dados apresentados anteriormente, o volume (Figura 19C) e o número de eosinófilos (Figura 19D) diminuiu durante o processo de formação do granuloma (ANEXO 3 – Tabela 3).

A população inteira de eosinófilos em granulomas reconstruídos em 3D está apresentada na Figura 19D, além da segmentação da imagem 3D (Figura 19E) para melhor visualização da localização espacial de eosinófilos. As infecções experimental e natural mostraram o mesmo padrão da compartimentalização espacial 3D de eosinófilos durante o ciclo de vida do granuloma (Figura 19D). A fase pré-granulomatosa (estágio PE) foi visualizada como uma coleção desordenada e muito densa de eosinófilos infiltrantes (Figura 19D, E). Contudo, em granulomas estabelecidos, os eosinófilos se organizam nas zonas periféricas (Figura 19D, E).

De modo geral, os eosinófilos habitam predominantemente uma região periférica distinta em todos os estágios evolutivos de granulomas esquistosomóticos, estabelecendo um nicho ecológico espaço-temporal conservado com implicações funcionais para a comunidade celular e o ciclo de vida do granuloma.

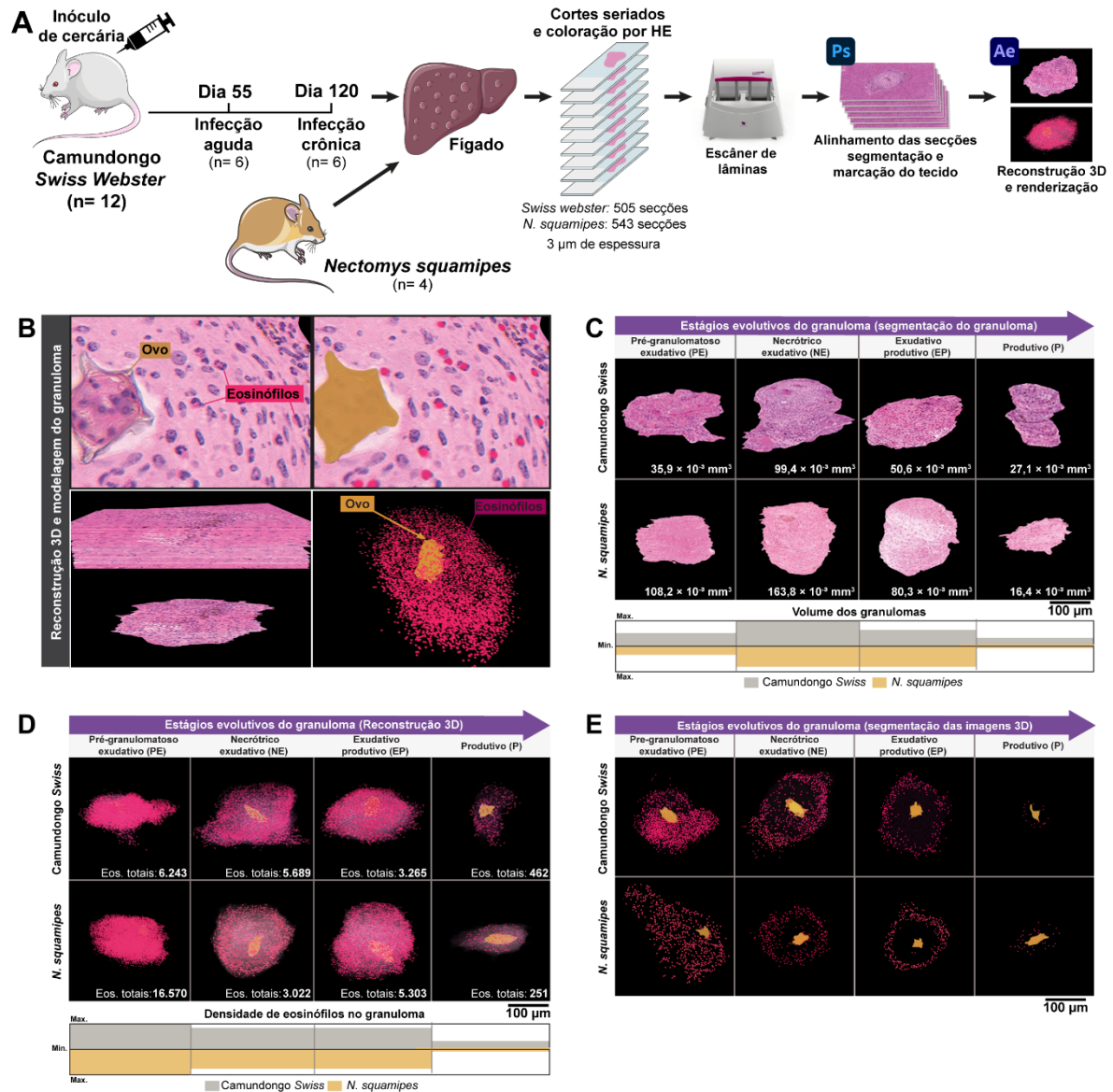


Figura 19. Reconstruções tridimensionais (3D) destacam o nicho de eosinófilos dentro de granulomas esquistossomóticos. **(A)** Desenho experimental para a reconstrução 3D de secções histológicas seriadas de granulomas hepáticos de camundongo *Swiss* e reservatório silvestre *N. squamipes*. O fígado de animais infectados por *S. mansoni* foram incluídos em resina plástica (GMA), seccionados de forma seriada em um micrótomo (3 µm de espessura) e corados com HE. No total, 1.048 secções foram escaneadas (505 de camundongo *Swiss* e 543 de reservatório silvestre *N. squamipes*) para a identificação de granulomas inteiros. As imagens seriadas foram alinhadas, os granulomas delineados e o tecido foi rotulado com o auxílio do software *Adobe Photoshop*. A reconstrução 3D e a renderização foram realizadas com o software *Adobe After Effects*. **(B)** Etapas da reconstrução 3D e modelagem de um granuloma EP representativo. O ovo do *Schistosoma*, marcado em amarelo, e os eosinófilos, identificados por sua típica morfologia (núcleo segmentado e citoplasma acidofílico corado em rosa com HE, conforme a Figura 13B), foram marcados manualmente em vermelho. As secções foram organizadas sequencialmente no eixo-z para formar a estrutura 3D. O granuloma foi segmentado do

tecido hepático para revelar a distribuição espacial de sua população de eosinófilos no microambiente granulomatoso. **(C)** Reconstrução de granulomas segmentados em todos os estágios evolutivos nos dois modelos de infecção. **(D)** Localização espacial 3D de eosinófilos nos diferentes estágios evolutivos de granulomas. **(E)** Interior de granulomas reconstruídos em 3D após segmentação. Enquanto eosinófilos aparecem como uma coleção de células desordenadas na fase pré-granulomatosa (fase PE), a localização preferencial de eosinófilos, na periferia, é descoberta ao longo dos estágios granulomatosos (NE, EP e P).

7. DISCUSSÃO

Estudos de diferentes modelos de infecção por *S. mansoni* são considerados importantes na investigação dos parâmetros biológicos da esquistossomose mansônica, principalmente no decorrer da resposta inflamatória granulomatosa nos tecidos-alvo da doença. Estes estudos contribuem para o melhor entendimento das funções inerentes às células do sistema imune no contexto da formação e desenvolvimento destes granulomas nos seus diferentes estágios evolutivos e nas diferentes fases da doença (LLANWARNE; HELMBY, 2021). A resposta inflamatória granulomatosa ao redor dos ovos do parasito é a característica patológica mais marcante do hospedeiro vertebrado (TAKAKI *et al.*, 2021).

Granulomas esquistossomóticos são considerados ecossistemas evolutivos dinâmicos caracterizados por uma matriz extracelular heterogênea onde estão inseridas diversas populações celulares inflamatórias (MALTA *et al.*, 2021). O objetivo desta estrutura é isolar as toxinas liberadas pelos ovos do parasito *S. mansoni* que são hepatotóxicas (MALTA *et al.*, 2022). Inicialmente, as populações celulares colonizam o granuloma de forma desordenada (fase pré-granulomatosa). À medida que esse ecossistema se desenvolve, as populações celulares sintetizam gradualmente a matriz extracelular, principalmente fibras colágenas, do granuloma e passam a se organizar em camadas (fase granulomatosa). Por fim, o granuloma atinge um estado involucional, no qual a quantidade de células está escassa, seu tamanho diminui e as fibras colágenas estão mais espessas e abundantes, uma característica de cura por fibrose (Figura 13) (LENZI *et al.*, 1998).

Dentre as principais populações celulares inflamatórias que colonizam granulomas esquistossomóticos hepáticos, os eosinófilos são majoritariamente recrutados aos granulomas, principalmente na fase pré-granulomatosa, constituindo mais de 50% da comunidade celular do granuloma. Dentro do granuloma, a proporção de eosinófilos em relação às demais células é menor (aproximadamente 30%) comparada à da fase pré-granulomatosa, mas se mantém constante durante os estágios evolutivos tanto na fase aguda como crônica em camundongos (Figura 14). Interessantemente, no modelo natural de infecção, foi observada uma diminuição progressiva na proporção de eosinófilos ao longo da evolução do granuloma. Este é um indicativo de uma melhor adaptação da inflamação granulomatosa, onde os eosinófilos podem estar associados a uma modulação menos intensa nestes granulomas, indicando uma adaptação fisiológica devido às altas taxas de (re)infecção pelo *S. mansoni* (AMARAL *et al.*, 2017; CHUAH *et al.*, 2014).

Embora a visão tradicional de que eosinófilos são células matadoras de helmintos, como o *S. mansoni*, atuando como parte da resposta imune inata, a presença massiva de eosinófilos em granulomas contendo ovos de *S. mansoni* permanece um enigma (MITRE; KLION, 2021). No presente trabalho, o qual pode ser considerado um dos estudos mais exaustivos sobre eosinófilos no contexto de granulomas até o presente momento, foi identificado um nicho ecológico de eosinófilos conservado nos modelos de infecção experimental (aguda e crônica) e natural. Análises quantitativas de imagem integrada ao procedimento de zonação digital aplicada a granulomas individuais e reconstruções 3D de granulomas inteiros revelaram que a maioria dos eosinófilos se alojam em um território específico – zona periférica – dentro dos limites do granuloma.

Espacialmente neste nicho, os eosinófilos estabelecem interações sólidas com outras células imunes e liberam os produtos estocados em seus grânulos, principalmente através da PMD. Nossas análises revelaram que não apenas eosinófilos maduros, mas também com maturação incompleta, com sinais morfológicos indicativos de imaturidade (Figura 16), habitam este nicho. Portanto, o termo “nicho ecológico”, ou seja, um microambiente específico no qual células podem se estabelecer, se diferenciar e interagir com outras populações celulares (MALTA *et al.*, 2021), pode ser completamente aplicado para definir a compartimentalização espacial de eosinófilos. Este trabalho contribui para uma melhor compreensão de granulomas esquistossomóticos, destacando que os eosinófilos, como células inflamatórias, não estão meramente concentrados, mas espacialmente adaptados ao microambiente.

Os achados deste trabalho confirmam, de forma robusta e confiável, a ocorrência desse nicho ecológico de eosinófilos nas diversas condições de infecção. Ao menos 80% de todos os granulomas evolutivamente maduros, analisados individualmente nos modelos de infecções experimentais (aguda e crônica) e natural, mostraram número predominante de eosinófilos nesse nicho. Isso é particularmente notável devido às diferenças significativas inerentes às infecções naturais e experimentais (ABATH *et al.*, 2006; ABDUL-GHANI; HASSAN, 2010). Infecções murinas experimentais envolvem uma única exposição com isolados de *S. mansoni*, tempo e dose de infecção definidos, enquanto infecções naturais são gradualmente adquiridas de isolados naturais do parasito, e com tempo de infecção indefinido (ABATH *et al.*, 2006). A maioria das espécies de *Schistosoma* em humanos são adquiridas gradualmente ao longo dos anos (CHEEVER *et al.*, 2002). Além disso, como observado pelo nosso e outros estudos, infecções naturais são menos intensas que as experimentais (ABATH *et al.*, 2006; ABDUL-GHANI; HASSAN, 2010).

Qual é o significado funcional de um “nicho ecológico do eosinófilo” em granulomas hepáticos causados pela esquistossomose mansônica? Nossos achados demonstram que, enquanto eosinófilos são irregularmente distribuídos na fase pré-granulomatosa (estágio PE), eles são altamente organizados nos granulomas evolutivamente maduros, provavelmente de forma a maximizar sua efetividade para a vida do granuloma. Como resultado potencial de tal organização, eosinófilos podem se comunicar de forma mais eficiente com outras células. Nossas análises ultraestruturais, capturaram que 72% dos eosinófilos, nesse nicho, interagem fisicamente com outras células do sistema imune, particularmente, linfócitos, neutrófilos, plasmócitos e macrófagos. O contato célula-célula, é um importante evento inerente ao funcionamento das células imunes dentro dos nichos ambientais, e considerado crítico para o desenvolvimento eficiente da imunorregulação (BELARDI *et al.*, 2020). Contendo proteínas catiônicas, como MBP-1, e diversas citocinas armazenadas em seus grânulos secretores, eosinófilos podem liberar diferencialmente e gradualmente esses mediadores imunes por PMD (MELO *et al.*, 2009; MELO; WELLER, 2010; WELLER; SPENCER, 2017). Este processo secretor, predominante na esquistossomose experimental (DIAS *et al.*, 2018), foi confirmado pelo presente estudo em ambas as fases da infecção experimental. PMD libera pequenas quantidades de mediadores imunes e não todo o conteúdo dos grânulos e vem sendo associada com funções imunomoduladoras dos eosinófilos (DIAS *et al.*, 2018; SAMARASINGHE *et al.*, 2017). Além disso, estudos do grupo já mostraram a ação de liberação de MBP-1 por transporte vesicular, tanto em humano quanto em camundongo (MELO *et al.*, 2009). Portanto, a consistente identificação tanto de PMD como de interações de eosinófilos com outras células imunes, apontam estas células como imunomoduladoras.

Além das interações célula-célula, à luz da Ecologia, existem fatores microambientais que governam a sobrevivência e diferenciação celular em um nicho ecológico (MALTA *et al.*, 2021). Dessa forma, a arquitetura espacial do nicho ecológico do eosinófilo pode beneficiar a diferenciação de eosinófilos *in situ*. Além de eosinófilos maduros, foi possível identificar uma população de eosinófilos em diferentes estágios de maturação. Estas células imaturas também foram capazes de estabelecer interações físicas por contato com outras populações de células inflamatórias na periferia do granuloma. Assim, nossos achados apontam para uma atividade imunorreguladora de eosinófilos na esquistossomose, mas seu impacto neste nicho ainda precisa ser esclarecido.

Similar aos nossos achados de eosinófilos imaturos dentro desse nicho, um estudo recente mostrou um alto número de eosinófilos em diferentes estágios de maturação que

também foi localizado na zona periférica de granulomas esquistossomóticos hepáticos de camundongos (FRANCISCO *et al.*, 2022). De fato, estudos têm demonstrado que o granuloma esquistossomótico hepático funciona como um local hematopoiético extramedular ativo, com potencial de produzir todas as linhagens mieloides (DUTRA *et al.*, 1997; LENZI *et al.*, 2006; ROSSI *et al.*, 1999). A compartimentalização espacial e maturação local emergiram recentemente como características importantes da biologia de eosinófilos, atuando como contribuintes chave para a diversidade funcional de eosinófilos (ARNOLD; MUNITZ, 2024; GURTNER; CREPAZ; ARNOLD, 2023).

De acordo com os conceitos explorados por este trabalho até aqui, pela primeira vez, foi realizada a investigação espaço-temporal da distribuição tridimensional (3D) de eosinófilos em granulomas hepáticos induzidos pela infecção experimental e natural por *S. mansoni*. A aplicação das análises de imagens em alta resolução confirmou que os granulomas esquistossomóticos são estruturas altamente dinâmicas durante os diferentes estágios de infecção pelo parasito, com os eosinófilos ocupando um nicho ecológico periférico.

Decifrar em detalhes a distribuição, comportamento e funções específicas de eosinófilos em granulomas, é de interesse considerável para o entendimento da esquistossomose. Isso tem sido uma tarefa desafiadora, especialmente devido à arquitetura complexa e dinâmica de granulomas esquistossomóticos. Enquanto a eosinofilia é tradicionalmente associada a destruição *in vivo* de ovos de *Schistosoma* em granulomas hepáticos (KEPHART *et al.*, 1984; KEPHART; ANDRADE; GLEICH, 1988; OLDS; MAHMOUD, 1980), modelos murinos deficientes de eosinófilos (BRUNET *et al.*, 1999; DE OLIVEIRA *et al.*, 2022; REIMAN *et al.*, 2006; SWARTZ *et al.*, 2006) ou camundongos tratados com anticorpo monoclonal anti-interleucina (IL)-5, uma citocina essencial para o desenvolvimento de eosinófilos (SHER *et al.*, 1990), não apresentaram impactos na carga parasitária de parasitos adultos ou ovos nos tecidos.

A ausência de eosinófilos parece não impactar também na formação de granulomas. A maioria dos trabalhos utilizando a depleção de eosinófilos não encontrou mudanças no tamanho e quantidade de granulomas (BRUNET *et al.*, 1999; SHER *et al.*, 1990; SWARTZ *et al.*, 2006) ou desenvolvimento de fibrose (SHER *et al.*, 1990; SWARTZ *et al.*, 2006), embora a redução da fibrose (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022; REIMAN *et al.*, 2006), assim como granulomas maiores (fase crônica) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022) ou menores (em ambas as fases aguda e crônica) (REIMAN *et al.*, 2006) também foram reportadas. Entretanto, a comparação entre estes múltiplos estudos é desafiadora, considerando que eles não levaram em consideração os estágios evolutivos de granulomas. As análises do presente trabalho mostraram que o

granuloma esquistossomótico é um sistema evolutivo que reduz em tamanho, número total de células e número de eosinófilos conforme a progressão do granuloma.

Os resultados do presente trabalho não sustentam um papel direto dos eosinófilos contra o parasito. A segregação da maioria dos eosinófilos e o seu conteúdo de MBP-1 na periferia de granulomas, e não na zona periovular, na qual os ovos do parasito são biologicamente ativos (SCHWARTZ; FALLON, 2018), sustentam um cenário inconsistente da visão de que os eosinófilos são “matadores de helmintos”. A descoberta de um nicho ecológico conservado de eosinófilos em granulomas esquistossomóticos contribui para o entendimento da complexa biologia de eosinófilos em infecções helmínticas e destacam as intrincadas interações eosinófilo-parasito-microambiente estabelecidas durante uma longa coevolução.

8. CONCLUSÕES

- (1) Este trabalho contribui para uma melhor compreensão de granulomas esquistossomóticos, destacando que os eosinófilos, como células inflamatórias, não estão meramente concentrados, mas espacialmente adaptados ao microambiente do granuloma.
- (2) Dentro de granulomas, formados tanto na infecção experimental (aguda e crônica) como natural, a maioria dos eosinófilos encontram-se espacialmente organizados e ocupam um nicho ecológico periférico, conservado ao longo do tempo.
- (3) Nesse nicho, eosinófilos interagem com outras células do sistema imune e secretam seu conteúdo principalmente através de PMD, desta forma indicando uma atividade reguladora modulando respostas imunes teciduais *in situ*.
- (4) A presença de eosinófilos imaturos dentro desse nicho ecológico indica que eventos de diferenciação/maturação de eosinófilos são importantes para a manutenção/ampliação dessas células nessa localização espacial.
- (5) A identificação de um nicho ecológico de eosinófilos na zona periférica de granulomas evolutivos e não na zona periovular, revela um cenário incompatível com a visão tradicional e primária dos eosinófilos como "destruidores de helmintos". Nossos dados apoiam uma função mais relacionada com imunorregulação.
- (6) A descoberta de um nicho ecológico de eosinófilos em granulomas formados na esquistossomose mansônica ressalta a complexa biologia da interação eosinófilo-parasito-microambiente durante infecções helmínticas.

9. REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. *et al.* Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 2, p. 85–91, fev. 2006.
- ABDEL AZIZ, N. *et al.* Type 2 immunity: a two-edged sword in schistosomiasis immunopathology. **Trends in Immunology**, v. 43, n. 8, p. 657–673, ago. 2022.
- ABDUL-GHANI, R. A.; HASSAN, A. A. Murine schistosomiasis as a model for human schistosomiasis mansoni: similarities and discrepancies. **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 1–8, 6 jun. 2010.
- ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil Granule Proteins: Form and Function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 25, p. 17406–17415, jun. 2014.
- ACKERMAN, S. J. *et al.* Comparative Toxicity of Purified Human Eosinophil Granule Cationic Proteins for Schistosomula of Schistosoma Mansoni. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 4, p. 735–745, 1 jul. 1985.
- AKUTHOTA, P. *et al.* Extracellular Microvesicle Production by Human Eosinophils Activated by “Inflammatory” Stimuli. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, p. 117, 27 out. 2016.
- AMARAL, K. B. *et al.* Histological assessment of granulomas in natural and experimental Schistosoma mansoni infections using whole slide imaging. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–20, 2017.
- ANTUNES, C. M. F. *et al.* Contribuição para o conhecimento do papel do “Rato Lava-Pés” Nectomys squamipes squamipes na epidemiologia da esquistossomose mansoni (Rodentia, Cricetidae). **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 23, p. 203–204, 1971.
- ARMENGOT, M.; GARÍN, L.; CARDA, C. Eosinophil Degranulation Patterns in Nasal Polyposis: An Ultrastructural Study. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 23, n. 5, p. 466–470, 1 set. 2009.
- ARNOLD, I. C.; MUNITZ, A. Spatial adaptation of eosinophils and their emerging roles in homeostasis, infection and disease. **Nature Reviews Immunology**, 9 jul. 2024.
- AU, M. F. F.; WILLIAMS, G. A.; HUI, J. H. L. Status Quo and Future Perspectives of Molecular and Genomic Studies on the Genus Biomphalaria—The Intermediate Snail Host of Schistosoma mansoni. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4895, 1 mar. 2023.
- AULA, O. P. *et al.* Schistosomiasis with a Focus on Africa. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 3, p. 109, 22 jun. 2021.
- BELARDI, B. *et al.* Cell–cell interfaces as specialized compartments directing cell function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 12, p. 750–764, 22 dez. 2020.

- BLANCHARD, C.; ROTHENBERG, M. E. **Biology of the Eosinophil**. In: *Advances in Immunology*. [S.l.]: Elsevier, 2009. p. 81–121.
- BONJOUR, K. *et al.* Mitochondrial Population in Mouse Eosinophils: Ultrastructural Dynamics in Cell Differentiation and Inflammatory Diseases. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 21 mar. 2022.
- BOROJEVIC, R. Experimental murine schistosomiasis mansoni: establishment of the chronic phase of the disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. Suppl 4, p. 171–174, 1992.
- BRUNET, L. R. *et al.* Interleukin 5 (IL-5) Is Not Required for Expression of a Th2 Response or Host Resistance Mechanisms during Murine Schistosomiasis Mansoni but Does Play a Role in Development of IL-4-Producing Non-T, Non-B Cells. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 3014–3018, jun. 1999.
- BUTTERWORTH, A. *et al.* Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 150, n. 6, p. 1456–1471, 1 dez. 1979.
- CARMO, L. A. S. *et al.* CD63 is tightly associated with intracellular, secretory events chaperoning piecemeal degranulation and compound exocytosis in human eosinophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 2, p. 391–401, 1 ago. 2016.
- CARUSO, R.; IRATO, E.; RIGOLI, L. Eosinophil exocytosis in a poorly differentiated tubular gastric adenocarcinoma: case report. **Ultrastructural Pathology**, v. 46, n. 1, p. 139–146, 2 jan. 2022.
- CATALANO, S. *et al.* Rodents as Natural Hosts of Zoonotic *Schistosoma* Species and Hybrids: An Epidemiological and Evolutionary Perspective From West Africa. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 3, p. 429–433, 2 jul. 2018.
- CHEEVER, A. W. *et al.* Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 917–940, out. 2002.
- CHIARINI-GARCIA, HÉLIO; PARREIRA, G. G.; ALMEIDA, F. R. C. L. **Glycol Methacrylate Embedding for Improved Morphological, Morphometrical, and Immunohistochemical Investigations Under Light Microscopy: Testes as a Model**. In: CHIARINI-GARCIA, H.; MELO, R. (Org.). *Light Microscopy. Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. p. 3–18.
- CHUAH, C. *et al.* Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 141–150, mar. 2014.
- COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 347–357, 5 ago. 2014.
- COLLEY, DANIEL G. *et al.* Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253–2264, 28 jun. 2014.

COLLINS, J. J. *et al.* An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, mar. 2011.

COSTA-NETO, S. F. DA *et al.* Biochemical and histological changes in liver of *Nectomys squamipes* naturally infected by *Schistosoma mansoni*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 519–524, dez. 2013.

COSTA-SILVA, M. *et al.* Natural *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes*: histopathological and morphometric analysis in comparison to experimentally infected *N. squamipes* and C3H/He mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. Suppl 1, p. 129–142, out. 2002.

DE BRUIN, A. M. *et al.* Eosinophil differentiation in the bone marrow is inhibited by T cell-derived IFN- γ . **Blood**, v. 116, n. 14, p. 2559–2569, 7 out. 2010.

DE JESUS, A. R. *et al.* Clinical and Immunologic Evaluation of 31 Patients with Acute Schistosomiasis mansoni. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 1, p. 98–105, jan. 2002.

DE OLIVEIRA, V. G. *et al.* Eosinophils participate in modulation of liver immune response and tissue damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Cytokine**, v. 149, n. 155701, 1 jan. 2022.

DENZLER, K. L. *et al.* Eosinophil Major Basic Protein-1 Does Not Contribute to Allergen-Induced Airway Pathologies in Mouse Models of Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 10, p. 5509–5517, 15 nov. 2000.

DIAS, F. F. *et al.* Identification of Piecemeal Degranulation and Vesicular Transport of MBP-1 in Liver-Infiltrating Mouse Eosinophils During Acute Experimental *Schistosoma mansoni* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 3019, 20 dez. 2018.

DO CARMO-SILVA, C. F. *et al.* Spatial and Seasonal Distribution of *Holochilus sciureus* with *Schistosoma mansoni* Infection in an Endemic Area for Schistosomiasis in Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 64, n. 4, p. 932–937, 1 dez. 2019.

DUTRA, H. S. *et al.* Haematopoietic capacity of colony-forming cells mobilized in hepatic inflammatory reactions as compared to that of normal bone marrow cells. **Research in Immunology**, v. 148, n. 7, p. 437–444, set. 1997.

DVORAK, A. M. *et al.* Crohn's disease: Transmission electron microscopic studies. **Human Pathology**, v. 11, n. 6, p. 606–619, nov. 1980.

DVORAK, H. F.; DVORAK, A. M. Basophilic Leucocytes: Structure, Function and Role in Disease. **Clinics in Haematology**, v. 4, n. 3, p. 651–683, out. 1975.

ERJEFALT, J. S. *et al.* Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. **Thorax**, v. 56, n. 5, p. 341–344, 1 maio 2001.

FALLON, P. G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunology Today**, v. 21, n. 1, p. 29–35, 1 jan. 2000.

FALLON, P. G.; SMITH, P.; DUNNE, D. W. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4⁺ and CD8⁺ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 4, p. 1408–1416, abr. 1998.

FRANCISCO, J. S. *et al.* The hepatic extramedullary hematopoiesis during experimental murine Schistosomiasis mansoni. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 955034, 25 ago. 2022.

GAUSE, W.; URBAN JR, J. F.; STADECKER, M. J. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 5, p. 269–277, maio 2003.

GENTILE, R. *et al.* An ecological field study of the water-rat *Nectomys squamipes* as a wild reservoir indicator of *Schistosoma mansoni* transmission in an endemic area. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. Suppl. 1, p. 111–117, 2006.

GENTILE, R.; NETO, S. F. DA C.; SERGIO, P. D. Uma revisão sobre a participação do rato d'água *Nectomys squamipes* na dinâmica de transmissão da esquistossomose mansônica: um estudo multidisciplinar de longo prazo em uma área endêmica. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 3, p. 711–725, set. 2010.

GRUNNET, M. L. Gomori's Trichrome Stain. Its use with myelin sheaths. **Archives of Neurology**, v. 35, n. 10, p. 692, 1 out. 1978.

GRYSEELS, B. *et al.* Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106–1118, 23 set. 2006.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383–397, jun. 2012.

GURTNER, A.; CREPAZ, D.; ARNOLD, I. C. Emerging functions of tissue-resident eosinophils. **Journal of Experimental Medicine**, v. 220, n. 7, 3 jul. 2023.

HABIB, M. R. *et al.* Invasion and Dispersal of Biomphalaria Species: Increased Vigilance Needed to Prevent the Introduction and Spread of Schistosomiasis. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 29, 10 fev. 2021.

HAILEGEBRIEL, T.; NIBRET, E.; MUNSHEA, A. Distribution and seasonal abundance of Biomphalaria snails and their infection status with *Schistosoma mansoni* in and around Lake Tana, northwest Ethiopia. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The *Schistosoma* granuloma: Friend or foe? **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 89, 15 abr. 2013.

HAWK, C. T.; LEARY, S.; MORRIS, T. **Formulary for Laboratory Animals**. 3rd. ed. [S.l.]: Wiley-Blackwell, 2005.

HOFFMAN, W.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation-concentration method in Schistosomiasis mansoni. **The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 9, p. 283–289, 1934.

HOGAN, S. P. *et al.* Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 5, p. 709–750, maio 2008.

HOLZSCHEITER, M. *et al.* Lack of host gut microbiota alters immune responses and intestinal granuloma formation during schistosomiasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 175, n. 2, p. 246–257, 3 jan. 2014.

HOTEZ, P. J. The poverty-related neglected diseases: Why basic research matters. **PLoS Biology**, v. 15, n. 11, 9 nov. 2017.

JAURÉGUIBERRY, S.; PARIS, L.; CAUMES, E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 3, p. 225–231, mar. 2010.

JENKINS, S. J. *et al.* Modulation of the host's immune response by schistosome larvae. **Parasite Immunology**, v. 27, n. 10–11, p. 385–393, 20 out. 2005.

JENKINS, S. J. *et al.* Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4-dependent and -independent pathways. **International Immunology**, v. 17, n. 11, p. 1409–1418, 1 nov. 2005.

JOSHI, A. D. *et al.* TLR3 modulates immunopathology during a Schistosoma mansoni egg-driven Th2 response in the lung. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 12, p. 3436–3449, 27 dez. 2008.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 38–43, jan. 2003.

KEPHART, G. M. *et al.* Deposition of eosinophil granule major basic protein onto microfilariae of Onchocerca volvulus in the skin of patients treated with diethylcarbamazine. **Laboratory Investigation**, v. 50, n. 1, p. 51–61, jan. 1984.

KEPHART, G. M.; ANDRADE, Z. A.; GLEICH, G. J. Localization of eosinophil major basic protein onto eggs of Schistosoma mansoni in human pathologic tissue. **The American Journal of Pathology**, v. 133, n. 2, p. 389–396, nov. 1988.

KLION, A. D.; ACKERMAN, S. J.; BOCHNER, B. S. Contributions of Eosinophils to Human Health and Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 15, n. 1, p. 179–209, 24 jan. 2020.

LEGER, E.; WEBSTER, J. P. Hybridizations within the Genus Schistosoma: Implications for evolution, epidemiology and control. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 65–80, 1 jan. 2017.

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

LENZI, H. L.; LENZI, J. A.; SOBRAL, A. C. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 20, n. 3–4, p. 433–435, 1 jan. 1987.

LENZI, H. L. *et al.* Histoarchitecture of Schistosomal Granuloma Development and Involution: Morphogenetic and Biomechanical Approaches. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 141–151, 1998.

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

LEWIS, F. A. *et al.* Large-scale laboratory maintenance of *Schistosoma mansoni*, with observations on three schistosome/snail host combinations. **The Journal of Parasitology**, v. 72, n. 6, p. 813–29, dez. 1986.

LIMA, D. O.; PINHO, G. M.; FERNANDEZ, F. A. S. Spatial patterns of the semi-aquatic rodent *Nectomys squamipes* in Atlantic forest streams. **Journal of Natural History**, v. 50, n. 7–8, p. 497–511, 24 fev. 2016.

LIMA, J. C. *et al.* Innate immune receptors are differentially expressed in mice during experimental *Schistosoma mansoni* early infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 119, n. e240013, 2024.

LINS, R. A. B. *et al.* A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 173–178, mar. 2008.

LIVINGSTON, D. P. *et al.* 3D volumes constructed from pixel-based images by digitally clearing plant and animal tissue. **Journal of Microscopy**, v. 240, n. 2, p. 122–129, 1 nov. 2010.

LLANWARNE, F.; HELMBY, H. Granuloma formation and tissue pathology in *Schistosoma japonicum* versus *Schistosoma mansoni* infections. **Parasite Immunology**, v. 43, n. 2, 18 fev. 2021.

LOGAN, M. R. *et al.* Expression of eosinophil target SNAREs as potential cognate receptors for vesicle-associated membrane protein-2 in exocytosis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, n. 2, p. 299–306, fev. 2002.

MALIK, A.; BATRA, J. K. Antimicrobial activity of human eosinophil granule proteins: Involvement in host defence against pathogens. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 168–181, maio 2012.

MALM-ERJEFÄLT, M. *et al.* Circulating eosinophils in asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis lack morphological signs of degranulation. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 35, n. 10, p. 1334–1340, 20 out. 2005.

MALTA, K. K. *et al.* Changing our view of the *Schistosoma* granuloma to an ecological standpoint. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 96, n. 4, p. 1404–1420, 1 ago. 2021.

MALTA, K. K. *et al.* Schistosomiasis Mansonii-Recruited Eosinophils: An Overview in the Granuloma Context. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, 2022.

MARIETTA, E. *et al.* A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 8, p. 1090–1097, 15 out. 2004.

MASAMBA, P.; KAPPO, A. P. Immunological and biochemical interplay between cytokines, oxidative stress and schistosomiasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, 1 jul. 2021.

MAZZEO, C. *et al.* Exosome secretion by eosinophils: A possible role in asthma pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 6, p. 1603–1613, jun. 2015.

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

MELO, R. C. N. *et al.* Eosinophil-derived cytokines in health and disease: Unraveling novel mechanisms of selective secretion. **Allergy**, v. 68, n. 3, p. 274–284, 2013.

MELO, R. C. N. *et al.* Human Eosinophils Secrete Preformed, Granule-Stored Interleukin-4 Through Distinct Vesicular Compartments. **Traffic**, v. 6, n. 11, p. 1047–1057, 12 nov. 2005.

MELO, R. C. N. *et al.* Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 2, p. 229–236, 1 fev. 2008.

MELO, R. C. N. *et al.* Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. **Laboratory Investigation**, v. 89, n. 7, p. 769–781, jul. 2009.

MELO, R. C. N. *et al.* Whole Slide Imaging and Its Applications to Histopathological Studies of Liver Disorders. **Frontiers in Medicine**, v. 6, n. 310, 8 jan. 2020.

MELO, R. C. N.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. **Eosinophil Ultrastructure. Atlas of Eosinophil Cell Biology and Pathology**. [S.l.]: Elsevier, 2022.

MELO, R. C. N.; SILVA, T. P. Eosinophil activation during immune responses: an ultrastructural view with an emphasis on viral diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 116, n. 2, p. 321–334, 25 jul. 2024.

MELO, R. C. N.; WELLER, P. F. Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 104, n. 1, p. 85–93, 2018.

- MELO, R. C. N.; WELLER, P. F. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 10, p. 1341–1354, out. 2010.
- MELO, R. C. N.; WELLER, P. F. Unraveling the complexity of lipid body organelles in human eosinophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, n. 5, p. 703–712, 10 set. 2014.
- MELO, R. C. N.; WELLER, P. F. Vesicular trafficking of immune mediators in human eosinophils revealed by immunoelectron microscopy. **Experimental Cell Research**, v. 347, n. 2, p. 385–390, out. 2016.
- MICHELSON, E. H.; MOTA, E. Malacological observations bearing on the epidemiology of schistosomiasis in a rural Bahian community. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 24, n. 2, p. 75–82, 1982.
- MIRANDA, G. S. *et al.* New challenges for the control of human schistosomiasis: The possible impact of wild rodents in *Schistosoma mansoni* transmission. **Acta Tropica**, v. 236, 1 dez. 2022.
- MIRANDA, M. A. *et al.* Immunomodulatory effect of the alkaloidic extract of *Solanum lycocarpum* fruits in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 396–402, abr. 2013.
- MITRE, E.; KLION, A. D. Eosinophils and helminth infection: protective or pathogenic? **Seminars in Immunopathology**, v. 43, n. 3, p. 363–381, 24 jun. 2021.
- MIYABE, Y. *et al.* Eosinophil-mediated inflammation in the absence of eosinophilia. **Asia Pacific Allergy**, v. 11, n. 3, jul. 2021.
- MOLEHIN, A. J. Schistosomiasis vaccine development: update on human clinical trials. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, 22 jan. 2020.
- NELWAN, M. L. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 91, p. 5–9, 1 jan. 2019.
- NEVES, J. S.; WELLER, P. F. Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 6, p. 694–699, dez. 2009.
- NEVES, V. H. *et al.* Extracellular sombrero vesicles are hallmarks of eosinophilic cytolytic degranulation in tissue sites of human diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 116, n. 2, p. 398–408, 25 jul. 2024.
- OCHKUR, S. I. *et al.* Coexpression of IL-5 and Eotaxin-2 in Mice Creates an Eosinophil-Dependent Model of Respiratory Inflammation with Characteristics of Severe Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 12, p. 7879–7889, 15 jun. 2007.
- OLDS, G. R.; MAHMOUD, A. A. F. Role of Host Granulomatous Response in Murine Schistosomiasis *Mansoni*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 66, n. 6, p. 1191–1199, 1 dez. 1980.

O'SULLIVAN, J. A.; BOCHNER, B. S. Eosinophils and eosinophil-associated diseases: An update. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 2, p. 505–517, 1 fev. 2018.

PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. The Formation and Function of Granulomas. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 639–665, 26 abr. 2018.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499–511, jul. 2002.

PELLEGRINO, J.; MACEDO, D. G. A Simplified Method for the Concentration of Cercariae. **The Journal of Parasitology**, v. 41, n. 3, p. 329, jun. 1955.

PEREIRA, L. P. L. A. *et al.* Essential oils as molluscicidal agents against schistosomiasis transmitting snails - a review. **Acta Tropica**, v. 209, n. 105489, 1 set. 2020.

PERSSON, C.; ULLER, L. Theirs But to Die and Do: Primary Lysis of Eosinophils and Free Eosinophil Granules in Asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 189, n. 6, p. 628–633, 15 mar. 2014.

PICARD, M. A. L. *et al.* Sex-Biased Transcriptome of *Schistosoma mansoni*: Host-Parasite Interaction, Genetic Determinants and Epigenetic Regulators Are Associated with Sexual Differentiation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, 27 set. 2016.

PICOT, H. *Holochilus brasiliensis* and *Nectomys squamipes* (Rodentia-Cricetidae) natural hosts of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. Suppl 4, p. 255–260, 1992.

PIROVICH, D. B.; DA'DARA, A. A.; SKELLY, P. J. *Schistosoma mansoni* phosphoglycerate mutase: a glycolytic ectoenzyme with thrombolytic potential. **Parasite**, v. 29, p. 41, 9 set. 2022.

PONIKAU, J. U. *et al.* Striking deposition of toxic eosinophil major basic protein in mucus: Implications for chronic rhinosinusitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 2, p. 362–369, ago. 2005.

QADRI, F. Acute dehydrating disease caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 induce increases in innate cells and inflammatory mediators at the mucosal surface of the gut. **Gut**, v. 53, n. 1, p. 62–69, 1 jan. 2004.

RAQIB, R. *et al.* Persistence of Mucosal Mast Cells and Eosinophils in *Shigella*-Infected Children. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2684–2692, maio 2003.

REIMAN, R. M. *et al.* Interleukin-5 (IL-5) Augments the Progression of Liver Fibrosis by Regulating IL-13 Activity. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p. 1471–1479, mar. 2006.

REIMERT, C. M. *et al.* Eosinophil Activity in *Schistosoma mansoni* Infections In Vivo and In Vitro in Relation to Plasma Cytokine Profile Pre- and Posttreatment with Praziquantel. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 5, p. 584–593, maio 2006.

RODRIGO-MUÑOZ, J. M. *et al.* Eosinophil-derived extracellular vesicles: isolation and classification techniques and implications for disease pathophysiology. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 116, n. 2, p. 260–270, 25 jul. 2024.

RODRIGUES, J. G. M. *et al.* Alterations in blood glucose concentration in wild rodents, *Holochilus sciureus*, naturally infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 31, n. 2, 2022.

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

SAMARASINGHE, A. E. *et al.* Eosinophils Promote Antiviral Immunity in Mice Infected with Influenza A Virus. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 8, p. 3214–3226, 15 abr. 2017.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. *Schistosoma* “Eggs-iting” the host: Granuloma formation and egg excretion. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2492, 1 out. 2018.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim epidemiológico - Doenças tropicais negligenciadas. Ministério da Saúde**. Brasília, DF: [s.n.], 2021.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas**. Brasília, DF: [s.n.], 2014.

SHAHANA, S. *et al.* Ultrastructure of bronchial biopsies from patients with allergic and non-allergic asthma. **Respiratory Medicine**, v. 99, n. 4, p. 429–443, abr. 2005.

SHER, A. *et al.* Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 1, p. 61–65, jan. 1990.

SHIN, M. H.; LEE, Y. A.; MIN, D.-Y. Eosinophil-Mediated Tissue Inflammatory Responses in Helminth Infection. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 47, p. S125–S131, 2009.

SILVEIRA, F. F. **Bird and Mammal Evolution, Systematics and Ecology Lab - UFRGS: Rato-d’água (*Nectomys squamipes*)**. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/faunadigitalrs/mamiferos/ordem-rodentia/familia-cricetidae/rato-dagua-nectomys-squamipes/>>. Acesso em: 11 mar. 2024.

SKELLY, P. J.; DA’DARA, A. A. A novel, non-neuronal acetylcholinesterase of schistosome parasites is essential for definitive host infection. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1056469, 31 jan. 2023.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, n. 4, p. 695–700, 10 nov. 1965.

- SOUZA, F. P. C. DE *et al.* Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 4, p. 300–307, ago. 2011.
- SOUZA, M. A. A. DE; MELO, A. L. DE. **Ecological Aspects of Biomphalaria in Endemic Areas for Schistosomiasis in Brazil**. In: ROKNI, M. B. (Org.). Schistosomiasis. [S.l.]: IntechOpen, 2012. p. 193–208.
- SPENCER, L. A. *et al.* Eosinophil Secretion of Granule-Derived Cytokines. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 496, 27 out. 2014.
- STADECKER, M. J.; HERNANDEZ, H. J. The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 5, p. 217–221, 4 maio 1998.
- STANDLEY, C. J. *et al.* Zoonotic schistosomiasis in non-human primates: Past, present and future activities at the human-wildlife interface in Africa. **Journal of Helminthology**, v. 86, n. 2, p. 131–140, jun. 2012.
- SWARTZ, J. M. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. **Blood**, v. 108, n. 7, p. 2420–2427, 1 out. 2006.
- TAKAKI, K. K. *et al.* *Schistosoma mansoni* Eggs Modulate the Timing of Granuloma Formation to Promote Transmission. **Cell Host and Microbe**, v. 29, n. 1, p. 67, 13 jan. 2021.
- TEFERA, A.; BELAY, T.; BAJIRO, M. Epidemiology of *Schistosoma mansoni* infection and associated risk factors among school children attending primary schools nearby rivers in Jimma town, an urban setting, Southwest Ethiopia. **PLOS ONE**, v. 15, n. 2, 27 fev. 2020.
- THIENGO, S. C. *et al.* O que é Malacologia Médica? Qual sua importância? **Revista Agaronia**, v. 3, n. 3, p. 22–31, 2021.
- THOMPSON-SOUZA, G. A.; VASCONCELOS, C. R. I.; NEVES, J. S. Eosinophils: Focus on DNA extracellular traps. **Life Sciences**, v. 311, n. 121191, dez. 2022.
- TOSCANO, E. C. B. *et al.* Evaluation of NLRP3 and NLRP1 inflammasome pathways in patients with Alzheimer's disease: a clinicopathological study. **Alzheimer's & Dementia**, v. 19, n. S12, 25 dez. 2023.
- VANHEEL, H. *et al.* Activation of Eosinophils and Mast Cells in Functional Dyspepsia: an Ultrastructural Evaluation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 29 mar. 2018.
- VARELLA, K. *et al.* Helminth community of *Nectomys squamipes* naturally infected by *Schistosoma mansoni* in an endemic area in Brazil: A comparison of 22 years apart. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 24, n. 100941, ago. 2024.
- VON BÜLOW, V. *et al.* Does schistosoma mansoni facilitate carcinogenesis? **Cells**, v. 10, n. 1982, 1 ago. 2021.

WANG, B. *et al.* Stem cell heterogeneity drives the parasitic life cycle of *Schistosoma mansoni*. **eLife**, v. 7, n. e35449, 10 jul. 2018.

WANGWIWATSIN, A. *et al.* Transcriptome of the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni* during intra-mammalian development. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. 1–25, 1 maio 2020.

WECHSLER, M. E. *et al.* Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 96, n. 10, p. 2694–2707, out. 2021.

WELLER, P. F.; SPENCER, L. A. Functions of tissue-resident eosinophils. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 12, p. 746–760, 11 dez. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **73rd World Health Assembly**. Disponível em: <<https://www.who.int/about/governance/world-health-assembly/seventy-third-world-health-assembly>>. Acesso em: 19 maio 2024a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030**. Geneva, CH: [s.n.], 2020b.

10. ANEXOS

ANEXO 1 – Tabela 1. Dados histopatológicos de camundongos na infecção experimental aguda e crônica por *Schistosoma mansoni*.

Tipo de infecção	Estágio de granuloma	Número total de ovos por área de tecido (n/ mm ²)		Número total de ovos	Número médio de granulomas (Média ± erro padrão)		Número total de granulomas	Área média de granuloma (Média ± erro padrão mm ²)	Área total de granuloma (mm ²)	Proporção de tecido ocupado por granulomas (%)		Número médio de granulomas por área de tecido	Número médio de células por área de granuloma (Média ± erro padrão mm ²)	Número total de células	Número médio de eosinófilos por granuloma (Média ± erro padrão mm ²)	Número total de eosinófilos	Área média de secção de fígado (mm ²)	Área total de secção de fígado (mm ²)			
		PE	NE		EP	P				PE	NE								EP	P	PE
Infecção aguda (n=12 secções)	PE	0,74		381	0,67 ± 0,28	8	151	0,089 ± 0,001	0,0027	0,2	6,62	0,06 ± 0,02	192,9 ± 33,75	3.086	200,4 ± 49,0	1.603	23.920	14 ± 0,81	540		
	NE	17,17	22,52		7,67 ± 0,65	92		0,081 ± 0,004	0,0789	3,81		0,72 ± 0,09	267,3 ± 11,98		48.118					164,1 ± 10,33	14.933
	EP	6,24			4,25 ± 0,60	51		0,060 ± 0,004	0,0352	2,61		0,38 ± 0,05	214,0 ± 14,30		20.760					144,38 ± 13,53	7.384
	P	-			-	-		-	-	-		-	-		-					-	-
Infecção crônica (n=12 secções)	PE	0,14	33,78	334	0,17 ± 0,17	2	291	0,059 ± 0,0006	0,0004	0,19	4,99	0,01 ± 0,01	118,0 ± 26,32	472	130,5 ± 58,50	261	21.205	11 ± 0,67	828		
	NE	3,39			4,17 ± 0,85	50		0,049 ± 0,003	0,0248	1,20		0,25 ± 0,05	188,2 ± 13,09		18.816					100,6 ± 8,26	5.030
	EP	12,81			16,00 ± 1,38	192		0,033 ± 0,001	0,0666	3,19		0,94 ± 0,08	140,5 ± 7,18		44.966					74,08 ± 2,92	14.224
	P	3,02			3,92 ± 0,85	47		0,018 ± 0,001	0,0086	0,41		0,24 ± 0,06	64,13 ± 4,63		6.028					35,96 ± 3,64	1.690
Infecção aguda + crônica (n=24 secções)	PE	0,88	56,29	715	0,41 ± 0,17	10	442	0,0511 ± 0,001	0,0031	0,09	6,35	0,03 ± 0,01	177,9 ± 28,08	3.558	186,4 ± 40,71	1.864	45.125	17 ± 0,82	1.368		
	NE	20,56			5,92 ± 0,64	142		0,067 ± 0,002	0,1037	3,03		0,49 ± 0,07	239,1 ± 9,42		66.934					141,6 ± 7,71	19.963
	EP	19,05			10,12 ± 1,43	243		0,038 ± 0,001	0,1018	2,98		0,66 ± 0,08	135,1 ± 4,09		65.726					88,92 ± 4,08	21.608
	P	3,02			1,96 ± 0,58	47		0,018 ± 0,001	0,0086	0,25		0,12 ± 0,04	64,13 ± 4,63		6.028					35,96 ± 3,64	1.690

ANEXO 2 – Tabela 2. Dados histopatológicos de *Nectomys squamipes* na infecção natural por *Schistosoma mansoni*.

Infecção natural		Estágio de granuloma	Número total de ovos por área de tecido (n/ mm ²)	Número total de ovos	Número médio de granulomas (Média ± erro padrão)	Número total de granulomas	Área média de granuloma (Média ± erro padrão mm ²)	Área total de granuloma (mm ²)	Proporção de tecido ocupado por granulomas (%)	Número médio de granulomas por área de tecido	Número médio de células por área de granuloma (Média ± erro padrão mm ²)	Número total de células	Número médio de eosinófilos por granuloma (Média ± erro padrão mm ²)	Número total de eosinófilos	Área média de secção de fígado (mm ²)	Área total de secção de fígado (mm ²)
<i>Nectomys squamipes</i> (n = 12 secções)	PE	0,20	1,36	142	22,37 ± 2,68	17	0,031 ± 0,005	0,38	0,33	0,015 ± 0,05	121,9 ± 16,61	4.145	71,41 ± 13,27	1.214	14,01 ± 0,52	1.033
	NE	0,13			31,86 ± 2,60	13	0,040 ± 0,005	0,51	0,45	0,12 ± 0,03	136,2 ± 21,18	3.405	60,85 ± 6,91	791		
	EP	0,13			23,38 ± 3,75	8	0,023 ± 0,004	0,19	0,16	0,07 ± 0,03	118,6 ± 28,90	1.897	39,63 ± 16,83	317		
	P	0,90			14,64 ± 0,80	10 4	0,016 ± 0,001	1,66	1,44	0,90 ± 0,13	31,64 ± 2,23	5.948	10,38 ± 1,04	1.080		
						142			2,38			15.395		3.402		

ANEXO 3 – Tabela 3. Dados quantitativos de granulomas reconstruídos em 3D.

Modelo de infecção	Estágio de granuloma	Número total de secções	Espessura do granuloma (μm)	Volume do granuloma (10^{-3} mm^3)	Número total de eosinófilos	Eosinófilos por volume de granuloma ($\text{eos}/10^{-3} \text{ mm}^3$)
<i>Camundongo Swiss</i>	PE	60	180	35,9	6.243	173,9
	NE	69	207	99,4	5.689	57,2
	EP	67	201	50,6	3.265	64,5
	P	48	144	27,1	462	17,0
<i>Nectomys squamipes</i>	PE	89	267	108,2	16.570	153,1
	NE	74	222	163,8	3.022	18,4
	EP	81	243	80,3	5.303	66,0
	P	44	132	16,4	251	15,3

ANEXO 4 – Produção científica durante o período do doutorado (2020-2024): artigo submetido de primeira autoria oriundo dos resultados deste trabalho. **Revista:** Nature Communications; **Fator de Impacto:** 14,7 (2023); **Qualis CAPES:** A1.

**Spatiotemporal and 3D cellular architecture of evolving *Schistosoma granulomas*
uncover an ecological niche of eosinophils**

Luccas M. Barata^{1,2#}, Kássia K. Malta^{1#}, Vitor H. Neves^{1,2}, Cinthia Palazzi^{1,2}, Eliane G. Oliveira-Barros¹, Yasmin Aguiar^{1,2}, Felipe Kneip^{1,2}, Bruno A. Marcelino^{1,3}, Livia A. S. Carmo^{1,4}, João Felipe A. Gazeta¹, Pedro Henrique S. Santos¹, Maria Karolynna B. Milani¹, Michelle C. A. Paula⁵, Eliana C. B. Toscano⁵, Rosana Gentile⁶, Felipe F. Dias⁷, Thiago P. Silva^{1,3}, and Rossana C. N. Melo^{1,2,3*}

¹Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Rua José Lourenço Kelmer, Juiz de Fora, MG, 36036-900, Brazil; ²Cell Biology Graduate Program, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil; ³Biodiversity and Nature Conservation Graduate Program, UFJF, Juiz de Fora, Brazil; ⁴Laboratory of Communicable Diseases, Department of Parasitology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, PE, Brazil; ⁵Department of Pathology, UFJF Medical School, UFJF, Brazil; ⁶Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Reservoir Mammals, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil; ⁷Laboratory of Cellular Biology, Department of Biological Sciences, State University of Minas Gerais (UEMG), Campus Ibirité, MG, Brazil

* **For correspondence:** rossana.melo@ufjf.br

These authors contributed equally to this work.

Abstract

Eosinophils have been historically credited with host protection against helminth parasites such as *Schistosoma mansoni*, the causal agent of a major neglected tropical disease—schistosomiasis. These cells massively accumulate within granulomas, the pathological hallmark of *Schistosoma* infection, formed around organ-trapped parasite eggs. How eosinophils impact granuloma life remains unclear. A big hurdle in understanding the eosinophil role in schistosomiasis is the complex and dynamic granuloma nature. Here, we mapped eosinophils across evolutionary hepatic granulomas during mouse experimental infection (acute and chronic) and natural infection in a neotropical, wild reservoir for human schistosomiasis (water-rat *Nectomys squamipes*). With in-depth quantitative image analysis and 3D histological reconstructions of entire granulomas, we discover that, within granulomas from both experimental and natural infections, eosinophils are spatially organized and populate a peripheral, major ecological niche conserved across space and time. High-resolution single-cell imaging captured robust eosinophil interaction with other immune cells within this niche. This spatial compartmentalization, unassociated with parasite eggs, challenges the concept of eosinophil as a “helminth killer” cell and invigorates its view as an immunoregulatory cell of the tissue microenvironment in schistosomiasis.

Introduction

Schistosomiasis, an ancient disease caused by trematode worms of the genus *Schistosoma*, continues to plague millions across the globe with its parasitic embrace¹.² From a global public health perspective, schistosomiasis is considered the most important water-based disease, still spreading into non-endemic areas in parallel with human migratory flows and management of water resources in tropical and subtropical climate zones^{3,4}.

Schistosomiasis has been reported from 78 countries and is considered an “emblem of how hard is to prevent, control, and treat a neglected tropical disease”³. To date, no effective vaccine against this disease is available and treatment relies on a single drug—the anthelmintic praziquantel—with incomplete efficacy, limited supply and accessibility, and possibility of resistance⁵. Schistosomiasis is also an emblematic example of how challenging is to decipher the inner workings of a parasitic disease. Despite major advances in understanding this disease, the most prominent pathological feature of schistosomiasis—the granuloma—is still unresolved. *Schistosoma* granulomas are classically defined as highly organized immune cell aggregates settled around the parasite eggs trapped in target organs, mainly liver and intestines^{6,7}. Granulomas manifest prominently during schistosomiasis and have been paradoxically attributed with dual functions: serving as protective mechanisms for the host and conferring benefits to the parasite⁶. However, strategies to restrain their development are not yet available.

Our group has been rethinking the *Schistosoma* granuloma as an integrating and evolving ecosystem in which distinct cell populations colonize these structures in different space-time frames and establish complex interactions⁸. In particular, substantial attention has been directed towards the population of eosinophils, cells of the

innate immune system, due to their notable accumulation within *Schistosoma* granulomas^{9,10}

Historically, eosinophils have been related to host protection against helminths like *S. mansoni*, acting as destructive effector cells. This concept was substantiated by a sequence of works, mostly conducted during the 1970s, demonstrating eosinophil-mediated killing of *S. mansoni* larvae (schistosomula) and eggs in vitro^{11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20}. The idea that eosinophils are attracted, firmly adhere to *S. mansoni* surface, an interaction mediated by a ligand (IgG or C3 complement)²¹, and destroy this parasite through the release of their toxic granule-derived cationic proteins^{17, 22} strongly supported eosinophils as a “helminth killer” cell. However, the understanding of eosinophils as effector cells directly targeting the parasite lacks empirical validation from in vivo studies and the role of eosinophils during schistosomiasis remains speculative or controversial (reviewed in^{9, 10, 23}).

A significant challenge in comprehending the core function(s) of eosinophils in schistosomiasis is the intricacies of eosinophil-rich granulomas induced by this infection. As evolutionary primitive structures, *Schistosoma* granulomas modify their microarchitecture and cell community over time⁸. Although the formation of evolving granulomas is long recognized as a feature of the immune response to both human and experimental schistosomiasis mansoni²⁴, this fundamental evolutive aspect has garnered limited attention within the scope of research on the eosinophil biology associated with this helminthiasis. Therefore, it is essential to explore eosinophils within the granuloma framework.

In this study, we have investigated the spatial localization of eosinophils in numerous evolving granulomas formed in the liver during schistosomiasis mansoni. We provide in-depth quantitative image analysis and 3D histological reconstructions of

entire granulomas using two models of *S. mansoni* infection: an experimental (mice) and a natural (the neotropical, wild-reservoir for human schistosomiasis *Nectomys squamipes*). We identified that, during the entire granuloma life, most eosinophils occupy a major, peripheral ecological niche in which these cells establish tight interactions with other immune cells. This uncovered spatial pattern, conserved in evolutionary granulomas from both experimental and natural infections, and unassociated with parasite eggs, robustly supports a scenario inconsistent with a direct role for eosinophils towards the parasite.

Results

The *Schistosoma* granuloma is a dynamic evolutionary system

To better characterize the process of granuloma formation taking place in hepatic schistosomiasis, we microscopically examined a large tissue area (total of 1,368 mm²) of mice (n=6/group) experimentally infected with *S. mansoni*, a well-established animal model for this disease^{25, 26}. Samples were taken at day 55 post-infection, corresponding to a fully-developed acute phase characterized by the beginning of intense release of soluble egg antigens (SEAs) and a Th2 response and at day 120 post-infection, corresponding to a chronic phase, with continuous egg deposition^{25, 26, 27}.

To study liver histopathology in greater detail, we used a histological approach that integrates optimal fixation and processing with a plastic resin (glycol methacrylate - GMA) embedding²⁸. This method offers enhanced tissue resolution and improved visualization of inflammatory processes compared to traditional paraffin embedding^{26, 28}. In total, nine sections were collected per animal. Each group of three sections was serially acquired and stained with three different stains (hematoxylin and eosin/H&E; Gomori's trichrome, and fast green-neutral red) to facilitate the identification of tissue

and cellular morphological aspects (Fig. 1a). Then, a 300 μm interval was maintained between groups of three sections to deepen the organ and avoid reanalysis of the same granuloma²⁶. All sections were analyzed through whole slide imaging (WSI) (Fig. 1a).

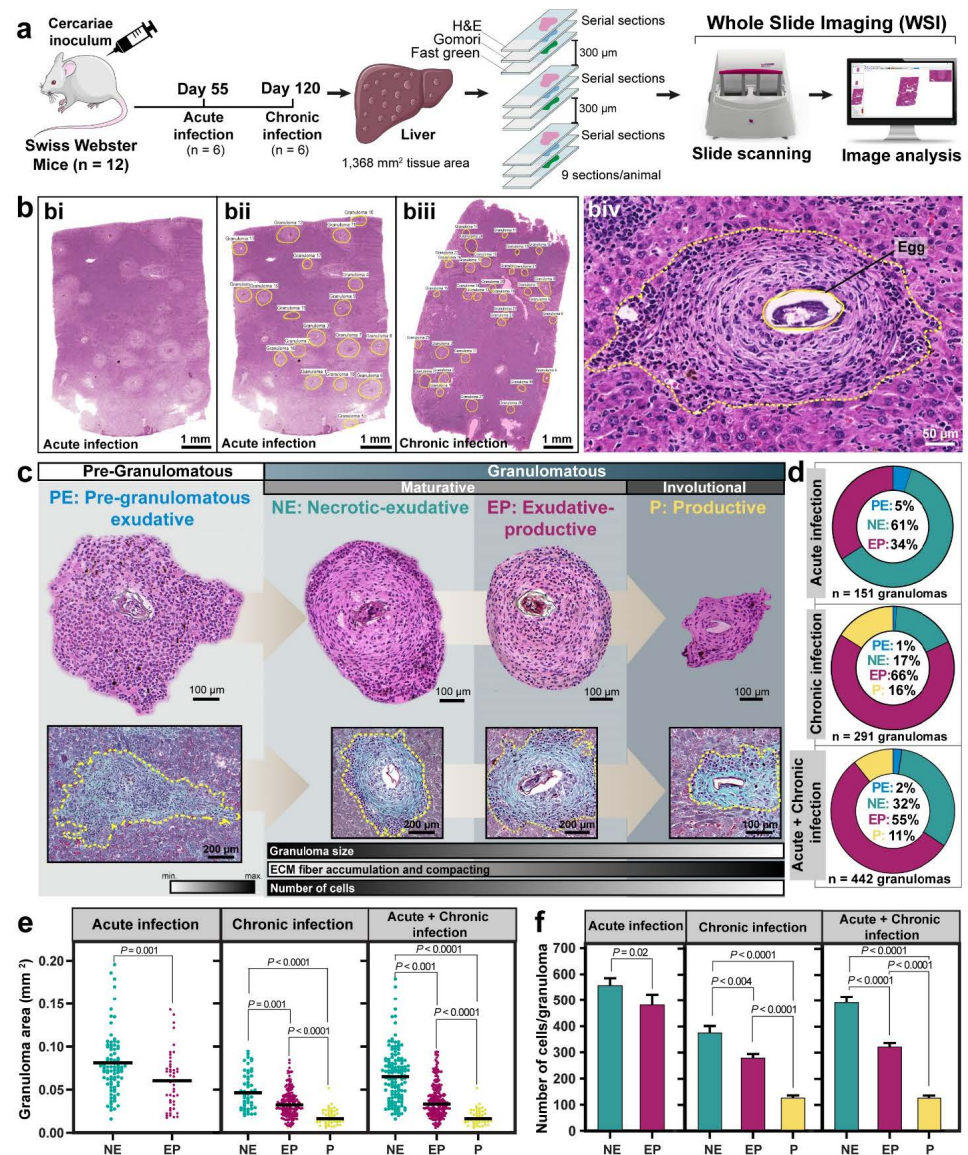


Fig. 1 The *Schistosoma* granuloma is a dynamic evolutionary system. **a** Experimental setup to analyze the histopathology of hepatic granulomas in mice with acute and chronic *S. mansoni* infection (n= 6 mice/group), infected with a single inoculum of 100 cercariae, LE strain. Nine hepatic sections were obtained per animal. Each three sections were serially acquired, stained with three different stains (hematoxylin and eosin/H&E; Gomori's trichrome, and fast-green-neutral red), and digitalized through whole slide imaging (WSI). A 300 μm interval was maintained between groups of three sections to deepen the organ and avoid reanalysis of the same granuloma. **bi-biv** In WSI scans of H&E-stained sections, all granulomas (total n= 442; 151 from acute phase and 291 from chronic phase) were outlined, enumerated, and classified per evolutive stage. **c-d** Pre-granulomatous and granulomatous phases and their evolutive stages (types and proportions). Granulomas are visualized with H&E and Gomori's staining, which highlights extracellular matrix (ECM) fibers, mainly collagen fibers, green. Progressive accumulation of collagen fibers is observed. **e-f** The granuloma size and its total number of cells are significantly reduced alongside granuloma life. Granuloma area (mm^2) was determined for individual granulomas. Scattered dots in **e** represent single granuloma data. A total of 142,246 cells (71,964 from 151 acute granulomas and 70,282 from chronic granulomas) was quantified and the mean number of cells was established per granuloma type. Results are expressed as means \pm SEM. *P* as indicated by Mann-Whitney test (acute infection) or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test (chronic and acute + chronic infection).

WSI enables digitalization of entire sections with the use of a digital slide scanner, thus generating high-resolution and wide-field microscopy images with detailed information about the tissue microarchitecture²⁹ (Fig. 1a). WSI revealed dramatic formation and extensive distribution of granulomas in the entire hepatic parenchyma in both acute and chronic infections (Fig. 1b and Supplementary Fig. S1). First, to quantitate granulomas, H&E-stained WSI sections were analyzed and all granulomas (total n=442 granulomas; 151 from acute and 291 from chronic infections) were outlined (Fig. 1bi-biv). Next, based on histopathological features^{24,25}, all granulomas were classified per their evolutive stage (Fig. 1c) as detailed in Supplementary Fig. S1. As reported before^{24,25}, the process of granuloma formation involved a pre-granulomatous and a granulomatous phase. The pre-granulomatous phase [termed pregranulomatous-exudative (PE) stage] is characterized by a disordered collection of cells around the parasite egg, which progresses to a highly organized assembly of cells and extracellular matrix (ECM) fibers (granulomatous phase) (Fig. 1c and Supplementary Fig. S1). Once established, *Schistosoma* granulomas tend to be spherical and more compact, evolving from a maturative to an involutinal state (Fig. 1c

and Supplementary Fig. S1). Thus, recapitulating the human disease²⁴, our murine model of *S. mansoni* infection developed multiple granulomas seen at distinct evolutionary stages side by side in the same tissue section (Fig. 1c and Supplementary Fig. S1).

As a general feature of both acute and chronic infections, the initial stage (PE) was found in lesser proportion compared to the other stages (Fig 1d). The two mature forms of granulomas [termed necrotic-exudative (NE) and exudative-productive (EP)] (Fig. 1c and Supplementary Fig. S1) were the most frequent types of granulomas found in the hepatic parenchyma in both infection phases (Fig 1d), while the involutive form [termed productive (P)] (Fig. 1c and Supplementary Fig. S1) was observed only in the chronic infection (Fig. 1d). Thus, during its life, the *Schistosoma* granuloma gradually undergoes involution, reducing in size (area) with the disease progression (Fig. 1c, e).

Next, we evaluated the total number of cells and deposition of ECM fibers within granulomas. Our quantitative analyses of 142,246 cells (71,964 from 151 acute granulomas and 70,282 from 291 chronic granulomas) showed that the total number of cells progressively reduces alongside granuloma maturation (Fig. 1f and Supplementary Table I). In parallel, there is increased accumulation and compacting of ECM fibers, mainly collagen fibers, which indicates the establishment of fibrosis, as observed in all Gomori-stained sections, which highlights collagen fibers green (Fig. 1c).

In line with our previous proposed viewpoint of a *Schistosoma* granuloma as an evolving ecosystem⁸, we thus confirmed that the fundamental nature of the *Schistosoma* granuloma relies on an evolutionary perspective gradually encompassing changes in its microstructure.

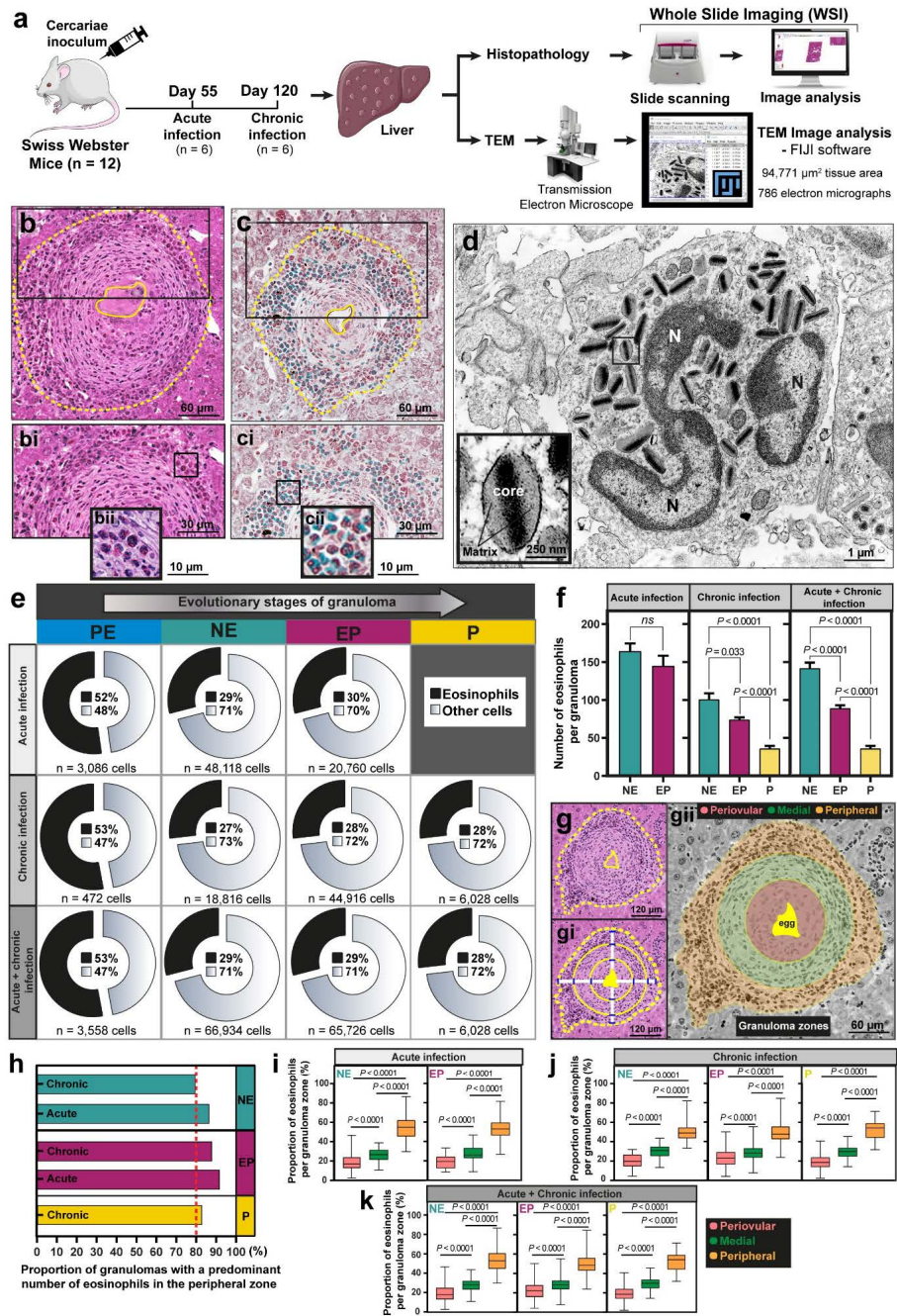


Fig. 2 Infiltrating eosinophils are spatially organized and populate a preferential site within granulomas. **a** Experimental setup to investigate eosinophil numbers and distribution within hepatic granulomas formed in mice with acute and chronic *S. mansoni* infection (n= 6 mice/group). Eosinophils were evaluated by both WSI of histological sections (n= 9 sections/animal) and transmission electron microscopy (TEM) (94,771 μm^2 of tissue area). **b-c** Representative granulomas showing eosinophils organized in layers and identified by their segmented nuclei and acidophilic cytoplasm stained pink (H&E) or green (fast green-neutral red), respectively. The boxed areas in **b** and **c** are shown in higher magnification in **bi/bii** and **ci/cii**. **d** A representative electron micrograph depicts the unique eosinophil ultrastructure. Secretory granules (seen in higher magnification in the boxed area) display a central electron-dense core and outer electron-lucent matrix. N, nucleus. **e** Proportions of eosinophils within the evolutionary stages of granulomas. The total number of cells/granuloma type is indicated. **f** The number of eosinophils/granuloma type significantly decreases alongside granuloma maturation. Results are expressed as means \pm SEM. *P* as indicated by Mann-Whitney test (Acute infection) and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test (Chronic and Acute + Chronic infection). ns, not significant. **g, gi, gii** Schematic representation of three spatial zones (peripheral, medial, and periovular) within a representative granuloma. **h** At least 80% of all granulomas (total n = 424) exhibited most eosinophils in their peripheral zone. **i-k** Eosinophil numbers are significantly higher in the granuloma peripheral zone compared to the medial and periovular zones. Results are expressed as means \pm SEM. *P* as indicated by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test [acute infection (NE, EP), chronic infection (NE, P) or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test [chronic infection (EP), acute + chronic Infection (NE, EP)].

Eosinophils are spatially organized and populate a preferential site within

***Schistosoma* granulomas**

The parasite eggs trapped in the liver attract a substantial population of eosinophils which colonize the hepatic tissue to form granulomas together with other immune and resident cells³⁰. Infiltrating eosinophils were evaluated by both WSI of histological sections (n=9 sections/animal) and transmission electron microscopy (TEM) (Fig. 2a). In WSI scans of granulomas (n=442), eosinophils were unambiguously identified by their segmented nuclei and typical highly acidophilic nature of their cytoplasmic secretory granules (specific granules), which appear pink (Fig. 2b, bi, bii) or green (Fig. 2c, ci, cii), when stained with H&E or fast green-neutral red, respectively. The accumulating presence of eosinophils was also confirmed with TEM which revealed the unique ultrastructure of eosinophil granules with a crystalline electron-dense core and an outer, electron-lucent matrix³¹ (Fig. 2d). A total of 45,125 eosinophils

(Supplementary Table I) was quantified and the proportion of these cells per granuloma stage was determined compared to the total number of cells (total $n=142,246$ cells) (Fig. 2e).

The pre-granulomatous (PE) stage, i.e., tissue sites in which immune cells are accumulating and in the process of organization into granulomas (Fig. 1c and Supplementary Fig. S1) depicted more than 50% of their total number of cells composed only of eosinophils (Fig. 2e). However, following granuloma formation in both acute and chronic infections, the proportion of eosinophils was smaller compared to the PE stage and remained stable in relation to the whole cell community (range of 27-30% of all granuloma cells) in all types of granulomas (Fig. 2e). Quantitative analyses showed that the total number of eosinophils ($n= 45,125$ eosinophils) significantly reduced in parallel with the disease progression (Fig. 2f and Supplementary Table I).

Notably, once inside a mature granuloma, eosinophils were not irregularly scattered as seen in the pre-granulomatous phase (Fig. 1c and Supplementary Fig. S1), but mostly organized in layers (Fig. 2b, c). To gain a deeper understanding of how the eosinophil population was arranged within granulomas, we next investigated their spatial distribution in more detail. Based on the parasite egg localization, three spatial granuloma zones—periovular, medial, and peripheral—(Fig. 2g, gi, gii)³² were digitally established as detailed (Supplementary Fig. S2), and the eosinophil number was quantitated in each zone. Our digital annotation strategy for granuloma zonation helped provide consistent zone measurements even when the section plane showed granulomas with eccentric eggs (Supplementary Fig. S2).

The investigation of zoned individual granulomas ($n=424$ granulomas, totalizing 1,272 annotated zones) revealed that at least 80% of all granuloma types (NE,

EP, and P) had a predominant number of eosinophils in the peripheral zone (Fig. 2h). Notably, quantitative analyses demonstrated a significantly greater proportion of eosinophils in the peripheral zone compared to the medial and periovular zones regardless the type of granuloma and time of infection (Fig. 2i, j, k). The least proportion of eosinophils was found in the periovular zone (Fig. 2i, j, k).

Classical roles of eosinophils are based on their effector responses associated with the release of their preformed pools of granule-stored products, including major basic protein (MBP)-1³³, an abundant eosinophil cationic protein³⁴. MBP is recognized as a classical marker for both eosinophil localization and degranulation³³. When released, MBP mediates cytotoxicity to a variety of tissues^{34,35} and is considered an *in vitro* helminthotoxin against *S. mansoni* larvae²². We next interrogated the spatial distribution of MBP-1 within evolutionary granulomas elicited by the acute and chronic experimental infection in mice (Fig. 3a). WSI scans of liver sections showed a robust and spatially well-defined MBP-1 staining in all granuloma types (Fig. 3b). Our zonation approach (Supplementary Fig. S2) applied to individual granulomas demonstrated a high MBP-1 concentration in the granuloma peripheral zone, with eggs negative or showing negligible immunolabeling for this protein (Fig. 3c, d). Additional quantitative analyses revealed that 73-91% of all granulomas (n=67 granulomas) had immunolabeling for MBP-1 predominantly localized in the peripheral zone (Fig. 3e). Thus, IHC for MBP-1 confirmed the preferential spatial localization of eosinophils in the peripheral zone of all evolutive stages of *Schistosoma* granulomas.

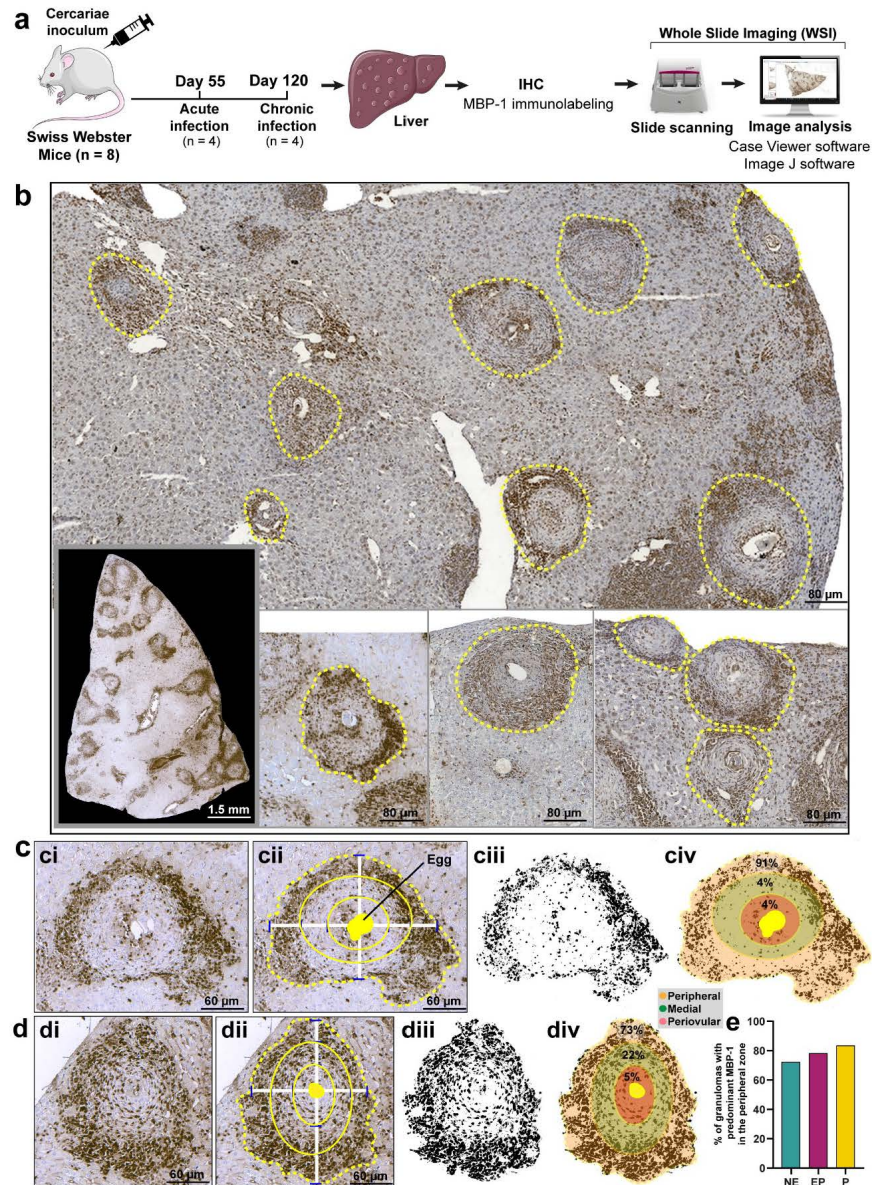


Fig. 3 MBP-1 is highly concentrated within the peripheral zone of *Schistosoma* granulomas. **a** Experimental setup to investigate major basic protein (MBP)-1 immunolabeling within evolutionary hepatic granulomas formed in mice with acute and chronic *S. mansoni* infection (n=4 animals per group). Liver sections (n=5/animal) were processed for immunohistochemistry (IHC) using a monoclonal anti-MBP-1 antibody and scanned through WSI. Granulomas (total n=67) were outlined, and enumerated, and the immunolabeling intensity was evaluated for determination of the immunostaining area (%). **b** Representative

WSI scans of the liver after IHC for MBP-1 reveal a high concentration of MBP-1, seen as a brown precipitate, within the peripheral zone of all granuloma types. c-d Zonation approach applied to representative granulomas for image analysis of the MBP-1 immunolabeling area (%) per zone. A range of 73-91% of all immunolabeling was localized in the peripheral zone. Granuloma binary images are shown in ciii and diii. e Quantitative analysis (n=67 granulomas) detected a predominance of MBP-1 staining in the peripheral zone of all granuloma stages.

Eosinophils establish direct interaction with other immune cells in the peripheral zone of *Schistosoma* granulomas

To identify relevant ultrastructural features of eosinophils while in the granuloma microenvironment, we performed a comprehensive study using TEM. TEM uniquely captures the cell behavior at high resolution in its tissue context, and it is particularly elucidative in demonstrating the intricate and varied secretory activities of eosinophils³¹. By analyzing a total of 786 electron micrographs from both acute and chronic infections, corresponding to a total area of 94,771 μm^2 (Fig. 4a), we uncover that eosinophils within the peripheral zone were tightly organized in clusters (Fig. 4b), and notably connected to other immune cells (Fig. 4c, d, e). We identified physical interaction between eosinophils and lymphocytes (Fig. 4c, d), neutrophils (Fig. 4d, e), macrophages (Fig. 4e), and plasma cells (Fig. 4e). At high magnification, cell-cell contacts appeared as small areas with increased thickness alongside the plasma membrane interfaces (Fig. 4c, ci). Of 275 eosinophils, 198 (72%) were contacting one or more immune cells (Fig. 4f). Our analyses also revealed that not only mature eosinophils (Fig. 2d, 4b, c, d) but also eosinophils with immaturity signs such as the presence of cytoplasmic coreless granules (immature specific granules) and high amount of ER strands^{31, 36} were present in the peripheral zone of *Schistosoma* granulomas (Fig. 4e, ei).

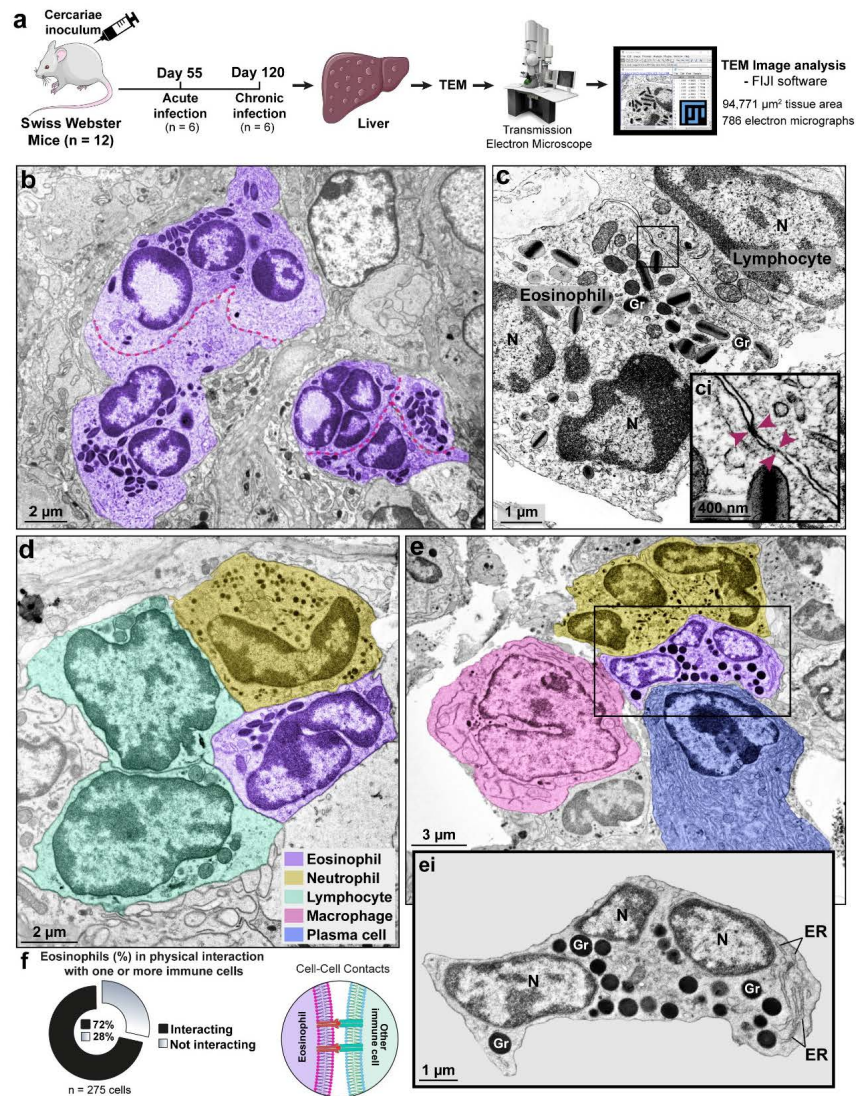


Fig. 4 Eosinophils establish physical interaction with other immune cells in the peripheral zone of *Schistosoma* granulomas. **a** Experimental setup to investigate the ultrastructure of eosinophils within the granuloma microenvironment. Hepatic granulomas from both acute and chronic infections were processed for transmission electron microscopy (TEM), and 786 electron micrographs, obtained from the peripheral zone (corresponding to a $94,771 \mu\text{m}^2$ of granuloma area) were analyzed with FIJI software. All intact eosinophils showing entire cell profile ($n=275$) were scored and individually examined at high resolution. **b** Clusters of eosinophils showing cell-cell interactions. Red lines outline the interface between eosinophils. **c** Eosinophil-lymphocyte interaction. The boxed area in **c** is shown in higher magnification in **ci**. Arrowheads indicate cell-cell contact sites. **d-e** An eosinophil is contacting several types of immune cells. **ei** Higher magnification of the boxed area in **e** shows an incompletely mature

eosinophil with coreless granules and a high amount of endoplasmic reticulum (ER) strands. f Most eosinophils (72%) were directly interacting with one or more immune cells. N, nucleus; Gr, secretory granule.

We next evaluated the occurrence of ultrastructural changes underlying eosinophil secretion, a process collectively known as degranulation^{31,36}. Single-cell imaging of eosinophils (n=275) revealed a prevalent morphologic pattern consistent with piecemeal degranulation (PMD), a frequent mode of eosinophil secretion in vivo during eosinophil-associated diseases (EADs)³⁷ (Supplementary Fig. S3). These results were consistent with previous work in acute schistosomiasis in mice²⁶. PMD is a vesicle-mediated secretory process involved in the release of small amounts of granule-derived proteins^{36,37,38}. PMD enables differential secretion of specific cytokines and MBP-1 and has been associated with eosinophil regulatory mechanisms modulating local immune responses^{26,33,39}.

Together, our TEM findings identify that, within the granuloma peripheral zone, eosinophils organize themselves, establish tight interactions with other immune cells, and secrete through PMD, thus supporting a potential immunoregulatory role for these cells rather than direct destruction of parasite eggs.

The spatial localization of eosinophils within *Schistosoma* granulomas is conserved in natural infection

The consistent eosinophil compartmentalization in the peripheral zone of granulomas from both acute and chronic experimental infection interrogated whether the same pattern occurs in natural infections. Then, we sought to investigate the liver of the neotropical, semi-aquatic rodent *N. squamipes* (water rat) (n= 4 animals) captured during a long-term study in endemic areas of schistosomiasis in Brazil (Fig. 5a)⁴⁰. *N. squamipes* plays a crucial role as wild reservoirs for human schistosomiasis,

perpetuating the transmission cycle in nature and serving as important biological indicators of the *S. mansoni* transmission sites due to their high susceptibility⁴¹. With wide geographic distribution, *N. squamipes* is one of the main non-human definitive hosts of *S. mansoni* in Brazil with well-characterized traditional parameters of the infection (consistent worm burden and egg deposition, and development of granulomatous responses)^{25,41}. Tissue sections (n=9/animal) stained with H&E were prepared and digitally scanned (WSI) (Fig. 5a) using the same approach as for the experimental infection (Fig. 1a) and a total of 142 hepatic granulomas corresponding to 1,033 mm² of tissue area were analyzed (Fig. 5a and Supplementary Table II).

The granulomatous inflammatory response of *S. mansoni*-infected *N. squamipes* manifested as well-defined lesions in the liver, as previously reported^{25,42}. We found the same evolutive stages of granulomas (Fig. 5b) as observed in the experimental infection (Fig. 1c), but with a higher prevalence of granuloma P-type (Fig. 5c). This may be attributed to the multiple reinfections experienced by this rodent throughout its lifetime, leading to subsequent acquired immunity and/or enhanced capacity to manage the infection²⁵. The presence of newly formed granulomas (PE and NE) informed that new eggs continue to reach the liver, likely due to repeated exposure to infectious cercariae, which is also a common aspect in humans living in endemic regions for schistosomiasis³⁰. Evolving granulomas had a progressive accumulation of ECM fibers and reduced cell numbers as the EP granulomas evolved to the P stages (Fig. 5b, d, e).

Next, we evaluated the population of eosinophils within granulomas (Fig. 5f, g) after staining with H&E (Fig. 5f, fi) or fast green-neutral red (Fig. 5g, gi). Our analyses revealed the same pattern of eosinophil accumulation seen in the experimental model: initially as a disordered cell collection in a pre-granulomatous phase (PE stage) (Fig. 5b), and subsequently, as an organized population within mature granulomas (Fig. 5f,

g). Eosinophil numbers significantly reduced alongside granuloma maturation and involution (Fig. 5h). The proportion of eosinophils (n= 3,402) in relation to the total number of granuloma cells (n=15,395) was higher in the PE stage (31%) compared to the other stages (range of 11-22%) (Fig. 5i).

We next investigated the spatial distribution of eosinophils within individual granulomas (n= 142) by applying our zonation approach as detailed in Supplementary Fig. S2. We found that (80-100%) of all evolutionary granulomas showed predominant numbers of eosinophils in the peripheral zone (Fig. 5k). Notably, quantitative analyses demonstrate a significantly higher proportion of eosinophils in the peripheral zone compared to the medial and periovular zones, with the lower proportions found in the periovular region (Fig. 5l).

Thus, our findings revealed that, within hepatic *Schistosoma* granulomas triggered by natural infection, eosinophils show a “spatial adaptation”, remaining mostly compartmentalized in the granuloma peripheral zone, a conserved localization reproduced, as noted, by the experimental infection.

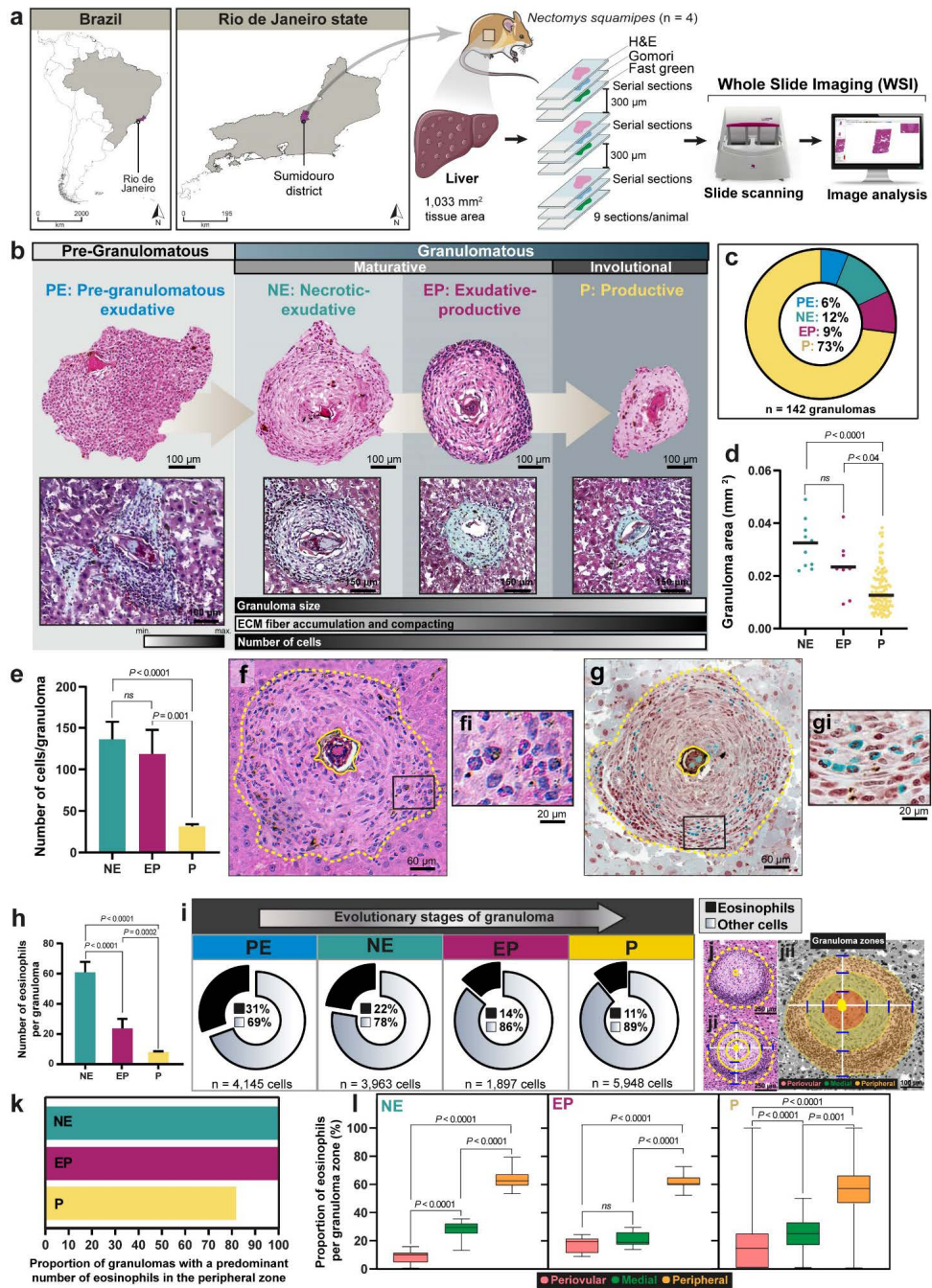


Fig. 5 Eosinophils show spatial adaptation within granulomas elicited by natural infection. **a** Experimental setup to analyze hepatic granulomas in the wild reservoir *N. squamipes* (n= 4) captured in an endemic area of schistosomiasis in Brazil (Sumidouro district, Rio de Janeiro state). After infection confirmation, tissue collection was performed for histopathology (n=9 sections/animal) using the same approach as established for the experimental infection in mice. In WSI scans of H&E-stained sections, all granulomas (n=142) were outlined, enumerated, and classified per evolutive stage. **b-c** Pre-granulomatous and granulomatous phases and their evolutive stages (types and proportions) observed after H&E and Gomori's staining. Progressive reduction in size and accumulation of collagen fibers, stained green, are noted. **d-e** The granuloma size (area) and its total number of cells are significantly reduced alongside granuloma life. Granuloma area (mm²) was determined for individual granulomas. Scattered dots in **d** represent single granuloma data. A total of 15,395 cells was quantified and the mean number of cells was established per granuloma type. Results are expressed as means \pm SEM. *P* as indicated by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. **f-g** Eosinophils identified within granulomas with their cytoplasm pink (H&E) or green (fast green-neutral red). The boxed areas in **f** and **g** are shown in higher magnification in **fi** and **gi**. **h** Number of eosinophils per granuloma type expressed as means \pm SEM. *P* as indicated by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. **i** Proportions of eosinophils (n=3,402) in relation to the total number of granuloma cells (n=15,395). **j** Representative granuloma after application of our zonation approach to quantitate eosinophils within the periovular, medial, and peripheral zones. **k** 80-100% of all granulomas (total n=142) exhibited most eosinophils in their peripheral zone. **l** Eosinophil numbers are significantly higher in the granuloma peripheral zone compared to the medial and periovular zones. Results are expressed as means \pm SEM. *P* as indicated by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test (NE, EP) or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test (P).

Eosinophils occupy a major ecological niche within *Schistosoma* granulomas

To further confirm the eosinophil spatial organization within the hepatic granulomas triggered by *S. mansoni* infection, we performed quantitative 3D histological reconstructions of entire granulomas (Fig. 6 and Supplementary Table III). A representative granuloma of each evolutionary stage (PE, NE, EP, and P) from both experimental and natural infections was fully sectioned, and after alignment and segmentation, eosinophils were mapped in each serial section through WSI before granuloma reconstruction (Fig. 6a, b, and Supplementary Video 1). With our unique approach, the volume of each granuloma type was calculated (Fig. 6c), and the cumulative presence of eosinophils was seen across the granuloma volume, separate from all other cells and ECM fibers (Fig. 6d). Consistent with our previous data here,

both volume (Fig. 6c) and the number of eosinophils (Fig. 6d) decreased during the process of granuloma formation (Supplementary Table III).

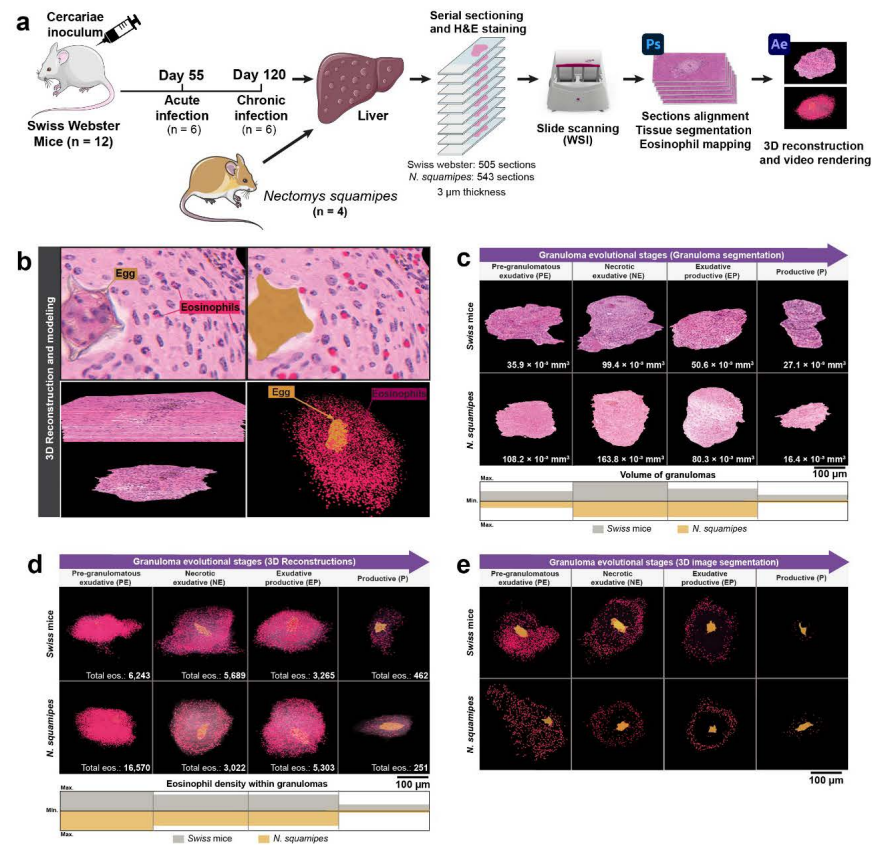


Fig. 6 Three-dimensional (3D) reconstructions highlight an eosinophil niche within *Schistosoma* granulomas. **a** Experimental setup for 3D reconstruction of serial histological sections of mice and *N. squamipes* hepatic granulomas. Livers from *S. mansoni*-infected animals were embedded in plastic resin (glycol methacrylate), serially sectioned in a microtome (3µm thickness), and H&E-stained. In total, 1,048 slides, each one containing one section, were scanned (505 from mice and 543 from *N. squamipes*) for whole granuloma identification and segmentation. Serial sections were aligned and tissue was labeled with the use of Adobe Photoshop software. 3D reconstruction and rendering were performed with Adobe After Effects. **b** Steps for 3D reconstruction and modeling of a representative EP granuloma. The *Schistosoma* egg (yellow) and eosinophils, identified by their typical morphology (segmented nuclei and acidic cytoplasm stained in pink with H&E staining as in Fig. 2b) were manually labeled red. Sections were then sequentially organized in the z-axis to form a 3D structure. The granuloma

was segmented from the hepatic tissue to reveal the spatial distribution of its eosinophil population within the granuloma microenvironment. c Reconstruction of segmented granulomas of all evolutionary stages from both infection models. d 3D spatial localization of eosinophils within the granuloma evolutionary stages. e Interior of the 3D reconstructed granulomas after segmentation. While eosinophils appear as a disordered cell collection in the pre-granulomatous phase (PE stage), the preferential localization of eosinophils is uncovered alongside the granulomatous stages (NE, EP, and P).

The entire eosinophil population within 3D-reconstructed granulomas is shown in Fig. 6d and after 3D image segmentation (Fig. 6e) for better visualization of the eosinophil spatial localization. Both experimental (Supplementary Video 2) and natural (Supplementary Video 3) infections showed the same pattern of 3D spatial compartmentalization of eosinophils throughout the granuloma life (Fig. 6d). The pre-granulomatous phase (PE stage) was visualized as a very dense and disordered collection of recruited eosinophils (Fig. 6d, e). However, within established granulomas, eosinophils organize themselves within the peripheral zone (Fig. 6d, e).

Taken together, eosinophils predominantly inhabit a distinct, peripheral region within evolving *Schistosoma* granulomas, thus delineating an ecological niche conserved across time and space and with functional implications to the cell community and granuloma life.

Discussion

Although the traditional view of eosinophils is that these cells kill parasitic helminths like *S. mansoni* as part of an innate immune response, the massive presence of eosinophils within *S. mansoni* eggs-containing granulomas remains an enigma^{9,10}. As one of the most extensive studies of eosinophils across evolving *Schistosoma* granulomas to date, we identified an ecological niche of eosinophils conserved in both experimental (acute and chronic) and natural infections. Quantitative image analyses integrated with a zonation approach applied to individual granulomas, and 3D reconstructions of entire granulomas revealed that most eosinophils lodge in a particular

territory within the granuloma boundaries. Spatially in this niche, eosinophils establish solid interactions with other immune cells and release their granule-stored products mainly through PMD. Yet, not only fully mature but also incompletely mature eosinophils inhabit this niche. Therefore, the term “ecological niche”, meaning a specific microenvironment in which cells can settle, differentiate, and interact with other cell populations⁸, can be fully applied to the uncovered eosinophil spatial compartmentalization. This work contributes to an expanding understanding of *Schistosoma* granulomas as locations in which inflammatory cells—eosinophils—are not merely concentrated but spatially adapted to the microenvironment.

Our findings highlight the robustness and reliability of the eosinophil ecological niche across diverse infection conditions. At least 80% of all evolutionary mature granulomas, individually analyzed in both experimental (acute and chronic) and natural infection models, showed a predominant number of eosinophils within this niche. This is particularly noteworthy due to the notable differences inherent to experimental and natural infections^{43,44}. Experimental murine infections involve a single exposure with defined *S. mansoni* isolates, time, and dose of infection, whereas natural infections are gradually acquired with natural isolates of the parasite and undefined time of infection⁴³. Most *Schistosoma* infections in humans are acquired gradually over years⁴⁵. Moreover, as noted by our study and others, natural infections are less intense than the experimental ones^{43,44}.

What is the functional meaning of an “eosinophil ecological niche” in hepatic granulomas triggered by schistosomiasis mansoni? Our findings demonstrate that, while eosinophils are irregularly distributed in a pre-granulomatous phase (PE stage), they are very organized within mature evolutionary granulomas in a way that could maximize their effectiveness to the granuloma life. As a potential result of such an organization, eosinophils can more efficiently communicate with other cells. Our TEM analyses at single-cell resolution captured that 72% of eosinophils in this niche interacted physically with other cells of the immune system, particularly lymphocytes, neutrophils, plasma cells, and macrophages. Cell-cell contact is an important event underlying the functioning of immune cells within environmental niches and considered critical for the development of efficient immunoregulation⁴⁶. Notably, eosinophils have a diverse arsenal of molecules, which potentially enable them to interact with every cell type in a tissue⁴⁷. As a source of cationic proteins such as MBP-1 and many cytokines,

eosinophils can differentially and gradually release these granule-derived immune mediators through PMD^{33,37,48}, a secretory process confirmed here during schistosomiasis²⁶ that may likewise reflect their role as immunoregulatory cells^{26,39}. Thus, our findings illuminate a regulatory activity for eosinophils, which may be modulating local tissue immune responses in schistosomiasis, but its impact within this niche is still to be clarified.

In addition to cell-cell interactions, in the light of Ecology, there are microenvironmental factors that can govern cell survival and differentiation within an ecological niche⁸. Thus, the spatial architecture of the eosinophil ecological niche may benefit eosinophil differentiation in situ. In line with our findings of immature eosinophils within this niche, a high number of eosinophils in different stages of maturation was localized in the peripheral zone of hepatic *Schistosoma* granulomas in mice⁴⁹. Spatial compartmentalization and local maturation have recently emerged as important features of eosinophil biology, acting as key contributors to eosinophil functional diversity^{50,51}.

Deciphering in detail the distribution, behavior, and specific functions of eosinophils within granulomas is of considerable interest to understanding schistosomiasis. This has been a challenging task, especially because of the complex architecture and dynamics of *Schistosoma* granulomas. While eosinophilia is traditionally linked to the in vivo destruction of *Schistosoma* eggs in hepatic granulomas^{52,53,54}, eosinophil-deficient mouse models^{55,56,57,58} or mice treated with a monoclonal antibody anti-interleukin (IL)-5, an essential cytokine for eosinophil development⁵⁹, showed no impact on worm or tissue egg burdens. The absence of eosinophils does not seem to impact the granuloma formation either. Most works using eosinophil depletion did not find changes in granuloma size and number^{55,56,59} or fibrosis development^{56,59}, although reduced fibrosis^{57,58}, as well as larger (chronic phase)⁵⁷ or smaller (in both acute and chronic phases)⁵⁸ granulomas were also reported. However, the comparability of these multiple studies is challenging, considering that they did not account for the evolutive stages of granulomas. Our analyses show that the *Schistosoma* granuloma is an evolutionary system that reduces in size, total number of cells, and number of eosinophils alongside granuloma maturation.

Our findings do not favor a direct role for eosinophils towards the parasite. The segregation of most eosinophils and their MBP-1 content in the peripheral zone of

evolutional granulomas, and not within their periovular zones, in which the parasite eggs are biologically active and secreting SEAs, ⁶⁰ supports a scenario inconsistent with the eosinophil view as “helminth killers”. The discovery of a conserved eosinophil ecological niche within *Schistosoma* granulomas contributes to the understanding of the complex eosinophil biology in helminth infections and highlights the intricate eosinophil-parasite-microenvironment interactions established during very long co-evolution.

Methods

Animals and models of infection

Mice

Swiss Webster female mice were obtained from the Federal University of Minas Gerais (UFMG) animal facility (Belo Horizonte, Brazil), and maintained under standard conditions. Animals aged 70 days were inoculated (n=12) or not (n=6) with a single inoculum of *S. mansoni* cercariae (100 cercariae/mouse), LE strain, as described ⁶¹. Animals were infected by an experienced technician at the Laboratory of Schistosomiasis (Department of Parasitology, UFMG, Brazil) where the LE strain of *S. mansoni* has been routinely maintained through successive passages in *Biomphalaria glabrata* and *Mesocricetus auratus* as described ⁶². The infection was confirmed by the presence of parasite eggs in the animal feces in the fifth week of infection ²⁶. All classical parameters confirmatory of a fully developed acute infection, such as: hepatomegaly; high density of eggs in the liver; well-characterized granulomatous inflammation around deposited eggs; alteration of liver enzymes; increased levels of Th2 cytokines and extensive eosinophil infiltration have been consistently demonstrated in this model ^{25,26}. We have complied with all relevant ethical regulations. Animal studies were approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethics Committee on Animal

Use (CEUA – *Comissão de Ética no Uso de Animais*/FIOCRUZ, protocol LW-32/2012), which follows the Brazilian guidelines recommended by the National Council for Animal Experimentation – CONCEA (*Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal*). All animals were monitored daily for survival and well-being (home cage evaluation, body condition, skin lesions, mobility, and other general conditions)⁶³.

Nectomys squamipes

The neotropical, semi-aquatic *N. squamipes*, also known as water rat, is a natural host for *S. mansoni* in Brazil with a wide geographical range^{41, 64}. *N. squamipes* specimens were captured in an endemic area (Sumidouro district, Rio de Janeiro state, Brazil) by the technical staff from the Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Mammals Reservoirs (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) as described⁴⁰ and under authorization of the Brazilian Government's Chico Mendes Institute for Biodiversity and Conservation (ICMBIO, license 13373). According to routine procedures, adult rodents were assessed to confirm infection by *S. mansoni* and other parasites and divided into two groups (infected and non-infected; n=4/group). Infected *N. squamipes* were identified by the presence of adult worms in mesenteric veins using perfusion of the portal-hepatic system⁴⁰. Worms recovered from each infected animal were counted with the aid of a stereomicroscope. In addition to the presence of adult worms in the mesenteric veins, positivity was confirmed by parasite eggs found in stool tests⁶⁵. All procedures followed the guidelines for the capture, handling, and care of animals of the Ethical Committee on Animal Use of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA, licenses LW81/12 and L-036/2018). Biosafety procedures and personal protective equipment,

including biosafety level three respirators, were used during all procedures involving animal handling and biological sampling.

Organ harvest

Mice were euthanized at day 55 (n=6) and 120 postinfection (n=6), corresponding to the acute and chronic phases of the disease, respectively, by exsanguination (full bleed) under deep anesthesia by cardiac puncture as before²⁶. The anesthetic protocols included ketamine (100mg /mL) combined with acepromazine (10 mg /mL) at a ratio of 9:1 (dose of 0.15 mL/100 g body weight)⁶⁶. *N. squamipes* specimens were euthanized through cardiac puncture after the application of anesthetics with perfusion of the portal-hepatic system as before⁴⁰. Tissue collection for *N. squamipes* was performed at the expedition site.

Specimen processing for histological analyses

Liver samples from infected and uninfected animals were removed from the right lobe and divided into approximately 5 mm³ fragments, which were immediately fixed in 4% paraformaldehyde in buffered phosphate, pH 7.4, 0.1M overnight at 4°C²⁶. Next day, the specimens were transferred to the same buffer solution and kept at 4°C for further histological processing. Samples were embedded in GMA (Leica Histo-resin Embedding Kit, Leica Biosystems, Heidelberg, Germany) for histopathological evaluation or Paraplast® (Sigma-Aldrich, USA) for IHC as described below. For the study of histopathological parameters, samples were dehydrated, embedded in GMA and cut at 3 µm-thickness using a microtome (Leica RM2155)²⁶. One advantage of this resin is to avoid tissue damage induced by heating required for the embedding step with classical paraffin embedding. Moreover, glycol methacrylate provides higher tissue resolution,

important to visualize fine morphological details. Better resolution is due to plastic polymerization that causes less shrinkage and retraction compared to conventional techniques²⁶. Nine tissue sections were obtained per animal. Each three sections were serially acquired and stained respectively with hematoxylin-eosin (H&E), Gomori's trichrome stain (Sigma-Aldrich) and Fast green-Neutral red (Sigma-Aldrich). An interval of 300 μm was kept between each group of three sections to ensure analysis of different granulomas, thus precluding reanalysis of the same granuloma²⁶. Sections stained with H&E were used for qualitative and quantitative evaluation of the granulomatous inflammation whereas Gomori's trichrome stain was applied for visualization of ECM fibers (fibrosis)²⁵. Eosinophils were detected in histological sections by their typical features: segmented nuclei, which stain purple (hematoxylin) or red (neutral red) and highly acidophilic cytoplasm due to the presence of a rich population of secretory granules, which stain pink (eosin)^{25,26} or green (fast green)⁶⁷.

Immunohistochemistry (IHC) for MBP-1

IHC was performed using a detection system (Novolink™ Polymer Detection Kit, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) and a rat monoclonal anti-mouse IgG2a MBP-1 primary antibody (clone 14.7.4, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Lee Laboratories, Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, USA) whose MBP-1 specificity has been well validated in previous studies^{26,68}. In brief, Paraplast®-embedded 5 μm -thick sections from mouse livers (n=4 animals/group) were deparaffinized, hydrated, washed in PBS 1x, pH = 7.4, and submitted to antigen retrieval with sodium-citrate buffer, pH = 6.0, moist heat, and pressure prior to immunolabeling⁶⁹. After blocking endogenous peroxidase and unspecific proteins with hydrogen peroxidase blocking solution and protein block solution (Novolink™), respectively, cells were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody. Next,

cells were incubated in a solution containing the secondary antibody (rabbit anti-mouse IgG, < 10 µg/mL in 10% v/v animal serum in tris-buffered saline 0.1%, ProClin™ 950, Novolink™), a polymer (anti-rabbit Poly-HRP-IgG, < 25 µg/mL, in 10%, v/v, animal serum in tris-buffered saline 0.1%, ProClin™ 950; Novolink™), and the diaminobenzidine chromogen (DAB) diluted in a substrate buffer with ≤ 0.1% hydrogen peroxide and preservative (Novolink™ Kit) for reaction visualization. For negative controls, a rat IgG2a kappa isotype control (R35-95, BD Biosciences) was used as a primary antibody to verify the specificity of the reaction. Positive staining was detected by brown-colored products in the cytoplasm.

Transmission electron microscopy (TEM)

Samples for TEM were prepared as before²⁶. Liver fragments containing granulomas were fixed in a mixture of paraformaldehyde 1% and glutaraldehyde 1.25% (EM grade, 50% aqueous, Electron Microscopy Sciences-EMS, Hatfield, PA, USA) in 0.1M phosphate-buffered saline, pH = 7.4, at room temperature. After 2 h, fragments were sliced into smaller pieces (1 mm³) and fixed in the same fixative solution described before overnight at 4°C. Then, fragments were washed twice in 0.1M sodium phosphate buffer for 4 h each at 4°C and kept in the same buffer for further processing. Post-fixing was done in 1% osmium tetroxide in Sym-Collidine buffer, pH 7.4, for 2 h at room temperature, followed by washing with sodium maleate buffer, pH 5.2. Samples were stained *en bloc* in uranyl acetate 2% (EMS) in 0.05 M sodium maleate buffer, pH 6.0, for 2 h at room temperature and washed in the same buffer as before. Then, samples were dehydrated in graded ethanol and acetone and infiltrated and embedded with a propylene oxide-Epon sequence (Eponate 12 Resin; Ted Pella, Redding, CA, USA). Polymerization happened at 60 °C for 16 h. Ultrathin sections were done with a Leica

ultramicrotome (EM UC6), placed on copper grids (Ted Pella), stained with lead citrate, and examined with a transmission electron microscope (Tecnai G2-20-ThermoFischer Scientific/FEI 2006, Eindhoven, the Netherlands) at 80–120 KV equipped with an MT NanoSprint43-MkII (43 megapixel) CCD camera. At least three grids from each sample were analyzed.

Image analysis

Whole Slide Imaging

Slides prepared for histological and IHC analyses were scanned using a 3D Histech Panoramic Scan Digital Slide Scanner (3D Histech Kft. Budapest, Hungary), which enables a resolution of 0.23 μ m per pixel, connected to a computer (Fujitsu Technology Solutions GmbH, Munich, Germany)²⁹. Tissue section areas were analyzed using Pannoramic Viewer 1.15.2 SP2 RTM (3D Histechkft.) and Histoquant (3D Histech kft.) software, which provide a morphometric detailed analysis with precise measurements of different morphological parameters as described below^{25, 29}.

Enumeration and classification of granulomas

Hepatic H&E-stained sections, obtained as above through WSI, were measured and all evolving granulomas (total n=442 from mice and n=142 from *N. squamipes*) were outlined and identified with a number. Granulomas lacking the egg were not included. The following morphometric parameters were evaluated: (i) enumeration and classification of each granuloma per evolutionary stage as detailed in (Supplementary Figure S1); (ii) frequency of each granuloma evolutionary stage; (iii) size (area) of individual granulomas; and (iv) total number of cells within each granuloma. In parallel,

Gomori's trichrome-stained sections subjacent to the H&E-stained sections, were inspected for visualization of ECM deposition and organization, which is helpful for the granuloma classification ²⁵.

Eosinophil quantification and distribution within granulomas

To analyze the number of eosinophils within each granuloma, high-resolution images from H&E-stained sections (n=9 sections/animal) of individual granulomas were acquired through WSI. Eosinophils were defined based on their typical histological features as described above and manually annotated. The following parameters were evaluated for each granuloma type: (i) total number of eosinophils and (ii) proportion of eosinophils compared to the total number of cells. Additionally, the numbers and spatial distribution (proportion) of eosinophils were evaluated within three different zones in each granuloma: periovular, medial, and peripheral, each one corresponding to one third of the granuloma area ^{32, 49}. Zones were established based on the distance from the lines of the perpendicular axis from egg shell to the boundary of the granuloma as detailed in (Supplementary Fig. S2).

IHC quantitative analysis

The slides were digitized at 20x magnification using the 3DHistech scanner (Budapest, Hungary) and analyzed at 20x magnification using the Case Viewer 2.3 software (Budapest, Hungary). The total area and the area fraction density of the MBP-1 immunolabeling were measured by semiautomatic morphometric analysis, using the ImageJ 1.53e software (National Institutes of Health, USA). The hematoxylin/DAB mask was selected and the brown pixels from DAB-stained cells were automatically

calibrated to create a binary image. The threshold of 0 to 132 pixels was applied to calculate area proportion of the immunostaining.

TEM qualitative and quantitative analyses

Electron micrographs showing infiltrated eosinophils were randomly acquired at different magnifications (total of 786 electron micrographs), and a total of 94,771 μm^2 of tissue area from the peripheral zones of hepatic granulomas was analyzed. To investigate the eosinophil ultrastructure, all eosinophils found in the tissue areas were scored (n=275) and the cells were evaluated for maturity, immaturity, and secretory aspects as described³¹ as well as their cell-cell interactions. The number of eosinophils in physical interaction with immune cells (cell-cell contacts) was established. All quantitative analyses were performed using Fiji ImageJ software (National Institutes of Health).

3D reconstructions of serially sectioned hepatic granulomas

3D reconstructions of entire granulomas were adapted from⁷⁰ using serial two-dimensional (2D) images obtained from the livers through WSI. Briefly, GMA-embedded 5 mm³ tissue blocks from both experimental (mice) and natural (*N. squamipes*) models of *S. mansoni* infections were serially cut at 3 μm on a microtome (Leica RM2155). In total, 505 serial sections were obtained from *Swiss* mice and 543 from *N. squamipes*. The sections were stained with H&E and scanned on a digital scanner as above. Representative granulomas (one for each evolutionary stage) were identified and serial images in TIFF format were captured for each granuloma type from the same animal based on alignment with *Adobe Photoshop* software (Adobe Inc., San

Jose, CA, USA). Next, infiltrating eosinophils in different regions of the granuloma and the parasite egg were identified as described above and highlighted in each serial-aligned image. The images were exported (PNG format) and sequentially imported into *Adobe After Effects* software (Adobe Inc.) to construct the 3D volumes. Lastly, animations were made using object rotation tools in the three spatial axes (x, y, z) and changes in layer opacity, position, and scale for a more complete visualization of the reconstructed tissue and eosinophil spatial localization.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed and graphs were made using GraphPad Prism[®] software, version 8.0.2 (San Diego, CA, USA). For two-group comparisons, the Student's t-test was applied for parametric variables, and the Mann-Whitney test was applied for non-parametric variables. For three-group or more comparisons, the one-way or two-way ANOVA test was performed, followed by the Tukey's post-test for parametric variables, or the Kruskal-Wallis test was used, followed by Dunn's multiple comparisons test for non-parametric variables. The level of significance used for all analyses was ≤ 0.05 . Data are presented as the mean \pm SEM unless otherwise specified. Data in bar plots graphs are expressed as means or mean \pm SEM. Data in box plot graphs are presented as minimal to maximal values and median.

Supplementary Material

Supplementary Fig. S1: Distribution and histopathological features of *Schistosoma* hepatic evolutionary granulomas.

Supplementary Fig. S2: Digital annotation workflow for granuloma zonation.

Supplementary Fig. S3: Eosinophils degranulate through piecemeal degranulation (PMD) within *Schistosoma* granulomas.

Supplementary Table I: Histopathological data from mice with acute and chronic infection of *Schistosoma mansoni*.

Supplementary Table II: Histopathological data from *Nectomys squamipes* naturally infected with *Schistosoma mansoni*.

Supplementary Table III: Quantitative data from 3D reconstructed granulomas.

Supplementary Video 1: 3D reconstruction steps

Supplementary Video 2: 3D reconstruction of hepatic granulomas from the experimental infection.

Supplementary Video 3: 3D reconstruction of hepatic granulomas from the natural infection.

Acknowledgments

The authors thank the members of Dr. Rossana Melo's lab for helpful discussions and the Laboratory of Schistosomiasis and Helminthology (Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil) for mice *S. mansoni* inoculation. The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology (grants 307270/2022-0 to RCNM and 151008/2024-8 to RCNM and TPS). The Lemann Foundation (Harvard University Lemann Brazil Research Fund). The Minas Gerais State Agency for Research and Development (FAPEMIG) (grants APQ-02930-21 and APQ-00754-23 for RCNM and BPD 00818/22 for RCNM and KKM). The Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Ministry of Education for the scholarships to LMB, VHN, and CP. CNPq for the scholarships to YPA, FK, and PS, and the UFJF for the scholarship to MKBM.

Additional information

Competing Interests

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Luccas M. Barata, Formal analysis, Data curation, Investigation, Visualization, Writing–original draft, Writing–review and editing; Kássia M. Malta, Formal analysis, Data curation, Investigation, Visualization, Writing–review and editing; Vitor H. Neves, Formal analysis, Methodology, Visualization, Writing–review and editing; Cinthia Palazzi, Eliane G. Oliveira-Barros, Yasmin Aguiar, Felipe Kneip, Bruno Marcelino, Livia A. S. Carmo, Pedro Henrique S. Santos, Maria Karolynna B. Milani, João Felipe A. Gazeta, Michele C. A. Paula, Formal analysis, Writing–review and editing; Felipe F. Dias, Investigation, Formal analysis, Writing–

review and editing; Eliana C. B. Toscano, Methodology, Formal analysis, Writing–review and editing; Rosana Gentile, Resources, Writing–review and editing. Thiago P. Silva, Supervision, Visualization, Writing–review and editing; Rossana C. N. Melo, Conceptualization, Resources, Project administration, Data curation, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Writing–original draft, Writing–review and editing.

References

1. Torres-Vitolas CA, Trienekens SCM, Zaadnoordijk W, Gouvras AN. Behaviour change interventions for the control and elimination of schistosomiasis: A systematic review of evidence from low- and middle-income countries. *PLoS Negl Trop Dis* **17**, e0011315 (2023).
2. WHO. World Health Organization guideline on control and elimination of human schistosomiasis. WHO (2022).
3. Di Bella S, Riccardi N, Giacobbe DR, Luzzati R. History of schistosomiasis (bilharziasis) in humans: from Egyptian medical papyrus to molecular biology on mummies. *Pathog Glob Health* **112**, 268-273 (2018).
4. Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* **6**, 411-425 (2006).
5. Toor J, *et al.* Are we on our way to achieving the 2020 goals for schistosomiasis morbidity control using current World Health Organization guidelines? *Clin Infect Dis* **66**, S245-S252 (2018).
6. Hams E, Aviello G, Fallon PG. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Front Immunol* **4**, 89 (2013).
7. Chuah C, Jones MK, Burke ML, McManus DP, Gobert GN. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends Parasitol* **30**, 141-150 (2014).
8. Malta KK, *et al.* Changing our view of the Schistosoma granuloma to an ecological standpoint. *Biological Reviews* **96**, 1404-1420 (2021).
9. Mitre E, Klion AD. Eosinophils and helminth infection: protective or pathogenic? *Sem Immunopathol* **43**, 363-381 (2021).
10. Malta KK, Palazzi C, Neves VH, Aguiar Y, Silva TP, Melo RCN. Schistosomiasis mansoni-recruited eosinophils: An overview in the granuloma context. *Microorganisms* **10**, 2022 (2022).
11. Butterworth AE, Sturrock RF, Houba V, Rees PH. Antibody-dependent cell-mediated damage to schistosomula in vitro. *Nature* **252**, 503-505 (1974).

12. James SL, Colley DG. Eosinophil-mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. *J Reticul Soc* **20**, 359-374 (1976).
13. Glauert AM, Butterworth AE. Morphological evidence for the ability of eosinophils to damage antibody-coated schistosomula. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **71**, 392-395 (1977).
14. Capron M, Torpier G, Capron A. In vitro killing of *S. mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: role of cytophilic antibodies. *J Immunol* **123**, 2220-2230 (1979).
15. Butterworth AE, *et al.* Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. II. The mechanism of irreversible eosinophil adherence. *J Exp Med* **150**, 1456-1471 (1979).
16. Ramalho-Pinto FJ, McLAREN DJ, Smithers SR. Complement-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils in vitro. *J Exp Med* **147**, 147-156 (1978).
17. McLaren DJ, McKean JR, Olsson I, Venge P, Kay AB. Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins in vitro. *Parasite Immunol* **3**, 359-373 (1981).
18. Kassis AI, Aikawa M, Mahmoud AAF. Mouse antibody-dependent eosinophil and macrophage adherence and damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* **122**, 398-405 (1979).
19. James SL, Colley DG. Eosinophil-mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs: III. Lymphokine involvement in the induction of eosinophil functional abilities. *Cell Immunol* **38**, 48-58 (1978).
20. Vadas M, David J, Butterworth A, Houba V, David L, Pisani N. Comparison of the ability of eosinophils and neutrophils, and of eosinophils from patients with *S. mansoni* infection and normal individuals, to mediate in vitro damage to schistosomula of *S. mansoni*. *Adv Exp Med Biol* **114**, 677-682 (1979).
21. Butterworth AE. Cell-mediated damage to helminths. *Adv Parasitol* **23**, 143-235 (1985).
22. Butterworth AE, Wassom DL, Gleich GJ, Loegering DA, David JR. Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J Immunol* **122**, 221-229 (1979).
23. Ackerman SJ, Stacy NI. Considerations on the Evolutionary Biology and Functions of Eosinophils: What the 'Haeckel'? *J Leuk Biol* **116**, 247-259 (2024).

24. Lenzi HL, *et al.* Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **93**, 141-151 (1998).
25. Amaral KB, *et al.* Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. *PLoS One* **12**, e0184696 (2017).
26. Dias FF, *et al.* Identification of piecemeal degranulation and vesicular transport of MBP-1 in liver-Infiltrating mouse eosinophils during acute experimental *Schistosoma mansoni* infection. *Front Immunol* **9**, 3019 (2018).
27. Borojevic R. Experimental murine schistosomiasis mansoni: establishment of the chronic phase of the disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **87 Suppl 4**, 171-174 (1992).
28. Fabrino DL, Ribeiro GA, Teixeira L, Melo RCN. Histological approaches to study tissue parasitism during the experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Methods Mol Biol* **689**, 69-80 (2011).
29. Melo RCN, Raas MWD, Palazzi C, Neves VH, Malta KK, Silva TP. Whole slide imaging and its applications to histopathological studies of liver disorders. *Front Med* **6**, 310 (2020).
30. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet* **383**, 2253-2264 (2014).
31. Melo RCN, Dvorak AM, Weller PF. *Eosinophil Ultrastructure. Atlas of Eosinophil Cell Biology and Pathology*. Elsevier (2022).
32. Lenzi HL, *et al.* Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. *Braz J Med Biol Res* **32**, 639-643 (1999).
33. Melo RCN, *et al.* Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. *Lab Invest* **89**, 769-781 (2009).
34. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem* **289**, 17406-17415 (2014).
35. Ponikau JU, *et al.* Striking deposition of toxic eosinophil major basic protein in mucus: implications for chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 362-369 (2005).
36. Melo RCN, Weller PF. Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. *J Leukoc Biol* **104**, 85-93 (2018).

37. Melo RCN, Weller PF. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histol Histopathol* **25**, 1341-1354 (2010).
38. Melo RCN, Liu L, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. *Allergy* **68**, 274-284 (2013).
39. Samarasinghe AE, *et al.* Eosinophils Promote Antiviral Immunity in Mice Infected with Influenza A Virus. *J Immunol* **198**, 3214-3226 (2017).
40. Varella K, Andrade-Silva BE, Costa-Neto SF, Oliveira-Cruz BA, Maldonado-Junior A, Gentile R. Helminth community of *Nectomys squamipes* naturally infected by *Schistosoma mansoni* in an endemic area in Brazil: A comparison of 22 years apart. *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 100941 (2024).
41. Gentile R, *et al.* An ecological field study of the water-rat *Nectomys squamipes* as a wild reservoir indicator of *Schistosoma mansoni* transmission in an endemic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101 Suppl 1**, 111-117 (2006).
42. Costa-Silva M, *et al.* Natural *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes*: histopathological and morphometric analysis in comparison to experimentally infected *N. squamipes* and C3H/He mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97 Suppl 1**, 129-142 (2002).
43. Abath FGC, Morais CNL, Montenegro CEL, Wynn TA, Montenegro SML. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol* **22**, 85-91 (2006).
44. Abdul-Ghani RA, Hassan AA. Murine schistosomiasis as a model for human schistosomiasis mansoni: similarities and discrepancies. *Parasitol Res* **107**, 1-8 (2010).
45. Cheever AW, Lenzi JA, Lenzi HL, Andrade ZA. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**, 917-940 (2002).
46. Belardi B, Son S, Felce JH, Dustin ML, Fletcher DA. Cell-cell interfaces as specialized compartments directing cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 750-764 (2020).
47. Jacobsen EA, Taranova AG, Lee NA, Lee JJ. Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J Allergy Clin Immunol* **119**, 1313-1320 (2007).
48. Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol* **17**, 746-760 (2017).

49. Francisco JS, Terra M, Klein GCT, Dias de Oliveira B, Pelajo-Machado M. The hepatic extramedullary hematopoiesis during experimental murine Schistosomiasis mansoni. *Front Immunol* **13**, 955034 (2022).
50. Arnold IC, Munitz A. Spatial adaptation of eosinophils and their emerging roles in homeostasis, infection and disease. *Nat Rev Immunol*, (2024).
51. Gurtner A, *et al.* Active eosinophils regulate host defence and immune responses in colitis. *Nature* **615**, 151-157 (2023).
52. Olds GR, Mahmoud AAF. Role of host granulomatous response in murine schistosomiasis mansoni: eosinophil-mediated destruction of eggs. *J Clin Invest* **66**, 1191-1199 (1980).
53. Kephart GM, Andrade ZA, Gleich GJ. Localization of eosinophil major basic protein onto eggs of *Schistosoma mansoni* in human pathologic tissue. *Am J Pathol* **133**, 389-396 (1988).
54. Kephart G, Gleich G, Connor D, Gibson D, Ackerman S. Deposition of eosinophil granule major basic protein onto microfilariae of *Onchocerca volvulus* in the skin of patients treated with diethylcarbamazine. *Lab Invest* **50**, 51 (1984).
55. Brunet LR, Sabin EA, Cheever AW, Kopf MA, Pearce EJ. Interleukin 5 (IL-5) is not required for expression of a Th2 response or host resistance mechanisms during murine schistosomiasis mansoni but does play a role in development of IL-4-producing non-T, non-B cells. *Infect Immun* **67**, 3014-3018 (1999).
56. Swartz JM, *et al.* *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood* **108**, 2420-2427 (2006).
57. de Oliveira VG, *et al.* Eosinophils participate in modulation of liver immune response and tissue damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Cytokine* **149**, 155701 (2022).
58. Reiman RM, *et al.* Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect Immun* **74**, 1471-1479 (2006).
59. Sher A, Coffman RL, Hieny S, Scott P, Cheever AW. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 61-65 (1990).
60. Schwartz C, Fallon PG. *Schistosoma* "Eggs-Itting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Front Immunol* **9**, 2492 (2018).
61. Pellegrino J, Macedo DG. A simplified method for the concentration of cercariae. *J Parasitol* **41**, 329-330 (1955).

62. Lewis FA, Stirewalt MA, Souza CP, Gazzinelli G. Large-scale laboratory maintenance of *Schistosoma mansoni*, with observations on three schistosome/snail host combinations. *J Parasitol*, 813-829 (1986).
63. Burkholder T, Foltz C, Karlsson E, Linton CG, Smith JM. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Current Protocols in Mouse Biology* **2**, 145-165 (2012).
64. Lima DO, Pinho GM, Fernandez FAS. Spatial patterns of the semi-aquatic rodent *Nectomys squamipes* in Atlantic forest streams. *J Nat Hist* **50**, 497-511 (2016).
65. D'Andrea PS, Maroja LS, Gentile R, Cerqueira R, Maldonado Junior A, Rey L. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea-Trematoda) in a naturally infected population of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia-Sigmodontinae) in Brazil. *Parasitology* **120 (Pt 6)**, 573-582 (2000).
66. Hawk CT, Leary SL, Medicine ACoLA, Medicine ECoLA. *Formulary for laboratory animals*, 3rd edn. Blackwell (2005).
67. Akuthota P, Capron K, Weller PF. Eosinophil Purification from Peripheral Blood. *Eosinophils: Methods and Protocols*, 13-20 (2014).
68. Ochkur SI, *et al.* Coexpression of IL-5 and eotaxin-2 in mice creates an eosinophil-dependent model of respiratory inflammation with characteristics of severe asthma. *J Immunol* **178**, 7879-7889 (2007).
69. Toscano ECB, *et al.* Hyperphosphorylated Tau in Mesial Temporal Lobe Epilepsy: a Neuropathological and Cognitive Study. *Molecular neurobiology* **60**, 2174-2185 (2023).
70. Livingston III DP, Tuong TD, Gadi SRV, Haigler CH, Gelman RS, Cullen JM. 3D volumes constructed from pixel-based images by digitally clearing plant and animal tissue. *J Microscopy* **240**, 122-129 (2010).

ANEXO 5 – Prêmios e honrarias durante o período do doutorado (2020-2024): menção honrosa em evento científico com trabalho apresentado a partir de resultados oriundos da tese.

Verifique o código de autenticidade 18854834.83418250.014719.8.8854834834182500147198 em <https://www.even3.com.br/documentos>



Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado **Spatial-Temporal Dynamics of Eosinophils in Granulomas during the Experimental and Natural Schistosoma mansoni Infection: A Histopathological and Tridimensional Approach**, apresentado no VIII Simpósio de Integração dos Programas de Pós-Graduação em Biologia Celular da UFMG, UFU, UFV e UFSJ (VIII SIBC) realizado entre os dias 17 a 20 de outubro de 2023, na cidade de Belo Horizonte - MG na modalidade **APRESENTAÇÃO ORAL** foi agraciado com **MENÇÃO HONROSA**.

Belo Horizonte, 20 de Outubro de 2023

Aline Zuber de Miranda
Coordenadora do evento

Realização



Apoio



ANEXO 6 – Produção científica durante o período do doutorado (2020-2024): artigo de revisão publicado em colaboração com outros projetos não relacionados a esta tese.

Ticks and Tick-borne Diseases 13 (2022) 101828



Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ttbdis



Review Article

Rhipicephalus microplus: An overview of vaccine antigens against the cattle tick



Diogo Fonseca Soares Pereira^a, Helen Silva Ribeiro^a, Ana Alice Maia Gonçalves^a, Augusto Ventura da Silva^a, Daniel Ferreira Lair^a, Diana Souza de Oliveira^a, Diego Fernandes Vilas Boas^a, Ingrid dos Santos Soares Conrado^a, Jaqueline Costa Leite^a, Luccas Miranda Barata^a, Pedro Campos Carvalhaes Reis^a, Reysla Maria da Silveira Mariano^a, Thaiza Aline Pereira Santos^a, Danielle Carvalho Oliveira Coutinho^a, Nelder de Figueiredo Gontijo^b, Ricardo Nascimento Araujo^b, Alexsandro Sobreira Galdino^c, Paulo Ricardo de Oliveira Paes^d, Marília Martins Melo^d, Ronaldo Alves Pinto Nagem^e, Walderez Ornelas Dutra^a, Denise da Silveira-Lemos^f, Daniel Sobreira Rodrigues^g, Rodolfo Cordeiro Giunchetti^{a,*}

^a Laboratory of Cell-Cell Interactions, Institute of Biological Sciences, Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^b Laboratory of Physiology of Hematophagous Insects, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Microbial Biotechnology Laboratory, Biochemistry, Federal University of São João Del-Rei, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil

^d Department of Veterinary Clinical Medicine and Surgery, College of Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^e Structural Biology and Biotechnology Laboratory, Department of biochemistry and immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^f Rosário Vellano University, UNIFENAS, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^g Santa Rita Experimental Field, EPAMIG Midwest, Prudente de Moraes, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

R. microplus
Efficacy
Vaccination
Protein
Peptide

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus, popularly known as the cattle tick, is the most important tick of livestock as it is responsible for significant economic losses. The use of chemical acaricides is still the most widely used control method despite its known disadvantages. Vaccination would be a safe alternative for the control of *R. microplus* and holds advantages over the use of chemical acaricides as it is environmental-friendly and leaves no residues in meat or milk. Two vaccines based on the Bm86 protein were commercialized, TickGARD® and Gavac®, with varying reported efficacies in different countries. The use of other vaccines, such as Tick Vac®, Go-Tick®, and Bovimmune Ixovac® have been restricted to some countries. Several other proteins have been analyzed as possible antigens for more effective vaccines against *R. microplus*, including peptidases, serine proteinase inhibitors, glutathione S-transferases, metalloproteases, and ribosomal proteins, with efficacies ranging from 14% to 96%. Nonetheless, more research is needed to develop safe and efficient tick vaccines, such as the evaluation of the efficacy of antigens against other tick species to verify cross-reactivity and inclusion of additional antigens to promote the blocking of the infection and spreading of tick-borne diseases. This review summarizes the discoveries of candidate antigens for *R. microplus* tick vaccines as well as the methods used to test their efficacy.

1. Introduction

Livestock is one of the most important and profitable agribusiness

activities worldwide, with a global population of approximately one billion head of cattle (Robinson et al., 2014). The world's second-largest cattle herd can be found in Brazil, with approximately 232 million head

* Corresponding author.

E-mail address: giunchetti@icb.ufmg.br (R.C. Giunchetti).

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101828>

Received 11 December 2020; Received in revised form 8 September 2021; Accepted 9 September 2021

Available online 23 September 2021

1877-959X/© 2021 Published by Elsevier GmbH.