

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

Cinthia Palazzi Miranda da Silva

**PERFIL MITOCONDRIAL DE EOSINÓFILOS HUMANOS NO CONTEXTO DA
ATIVAÇÃO CELULAR E DOENÇAS EOSINOFÍLICAS**

Belo Horizonte
2025

Cinthia Palazzi Miranda da Silva

**PERFIL MITOCONDRIAL DE EOSINÓFILOS NO CONTEXTO DA ATIVAÇÃO
CELULAR E DOENÇAS EOSINOFÍLICAS**

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 Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Rossana Correa Netto de Melo

Belo Horizonte

2025

- 043 Silva, Cinthia Palazzi Miranda da.
Perfil mitocondrial de eosinófilos humanos no contexto da ativação celular e doenças eosinofílicas [manuscrito] / Cinthia Palazzi Miranda da Silva. – 2025.
95 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. Mitocôndrias. 3. Citocinas. 4. Eosinófilo. 5. Inflamação.
I. Melo, Rossana Correa Netto de. II. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



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

ATA DE DEFESA DE TESE

CINTHIA PALAZZI MIRANDA DA SILVA

Às **quatorze horas** do dia **22 de maio de 2025**, 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: **"PERFIL MITOCONDRIAL DE EOSINÓFILOS HUMANOS NO CONTEXTO DA ATIVAÇÃO CELULAR E DOENÇAS EOSINOFÍLICAS"**, requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Rossana Correa Netto de Melo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Rossana Correa Netto de Melo	UFMG	Aprovada
Rafael Magno Costa Melo	UFMG	Aprovada
Felipe Ferraz Dias	UEMG	Aprovada
Letícia Coutinho Lopes Moura	UFJF	Aprovada
Lívia Teixeira	HCFMUSP	Aprovada

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

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 22 de maio de 2025.**

Rossana Correa Netto de Melo _____

Rafael Magno Costa Melo _____

Felipe Ferraz Dias _____

Letícia Coutinho Lopes Moura _____

Belo Horizonte, 14 de julho de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Livia Teixeira, Usuário Externo**, em 14/07/2025, às 11:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Ferraz Dias, Usuário Externo**, em 14/07/2025, às 11:38, 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 **Rafael Magno Costa Melo, Professor do Magistério Superior**, em 14/07/2025, às 11:39, 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 **Leticia Coutinho Lopes Moura, Usuária Externa**, em 15/07/2025, às 19:30, 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 21/07/2025, às 14:40, 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 4380831 e o código CRC 62C92D95.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha família como um todo que sempre se fez presente me apoiando e me incentivando nessa caminhada. Mas faço um agradecimento especial a minha mãe Rosimeire por ser sempre o meu maior apoio, já disse e reafirmo que tudo que sou e tudo que serei devo a esse anjo chamado mãe. A minha avó Roselaine, que sempre teve palavras de conforto e de calma nos momentos que mais precisei, me ajudando a relembrar que tudo acontece como deve ser. A minha tia e madrinha Daniele que sempre me fez acreditar que eu era capaz, sempre me incentivando a ir além e me lembrando que no final tudo acaba dando certo. Meu amor por vocês é profundo e imenso. Não existem palavras suficientes para descrever minha gratidão.

Ao meu namorado, Luiz Vitor, que mesmo chegando já no final do processo foi tão importante e me deu apoio e compreensão em muitos momentos difíceis, acolhendo meu choro e me dando forças para suportar o processo e oferecendo todo o carinho e afeto que eu precisava.

À professora Rossana Melo, pela orientação e suporte na minha formação enquanto pesquisadora, contribuindo para expandir meu pensamento e visão sobre fazer ciência. Agradeço pelos ensinamentos e sou imensamente grata.

A todo o grupo do Laboratório de Biologia Celular da UFJF, ao qual agradeço pelo que aprendi durante os anos de convivência, principalmente ao Thiago Silva, Kassia Malta e Yasmin Aguiar que foram essenciais para que eu completasse minha jornada, pois me deram suporte nos meus choros e lamentações, me incentivaram e me ajudaram muito na construção dessa tese se tornando além de colegas de laboratório grandes amigos que certamente vou levar para a vida. Agradeço também

ao Luccas que me ajudou a clarear a mente e as ideias nos meus momentos de desespero.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram com palavras de incentivo, carinho e afeto para lidar com momentos difíceis de pressão e estagnação ao longo da minha trajetória, em especial a Sheila e a Nathália por sempre me acolherem de forma leve e doce. Meu afeto por vocês é imenso.

À UFMG por permitir a realização deste trabalho e servir como base do meu processo formativo me possibilitando a oportunidade de crescimento e amadurecimento no meio científico e a possibilidade de obtenção deste título há muito tão almejado por mim. Meu processo formativo se divide em antes e depois da presença da instituição na minha vida. As agências de fomento CNPq, FAPEMIG, CAPES pelo apoio financeiro para participação em congressos e eventos científicos, em especial ao CNPq agência financiadora da bolsa que permitiu com que eu realizasse este trabalho.

À banca examinadora desta dissertação: Livia Teixeira, Felipe Dias, Rafael Melo e Letícia Moura que se dispuseram e a contribuir de forma efetiva para a melhoria da qualidade científica do meu trabalho. Não seria possível sem vocês.

A TODOS que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, mesmo não sendo citados individualmente, meus sinceros agradecimentos, pois sei que embora a obtenção do título seja nominal os esforços para que se chegue a ele e os êxitos do processo são fruto de trabalho coletivo. Nunca terei palavra suficientes para agradecer a todo o apoio que recebi durante o processo. O processo é desafiador, mas gratificante. É impossível chegar lá sozinho!

RESUMO

O papel desempenhado pelas mitocôndrias nas células do sistema imunológico tem chamado cada vez mais a atenção. As mitocôndrias são vistas como mediadoras das funções imunológicas e da inflamação e estão associadas a diversos processos biológicos, como a secreção de citocinas. No entanto, nossa compreensão atual da atividade, arquitetura e alterações morfológicas em mitocôndrias de eosinófilos sob condições patológicas ainda é pouco conhecida. Aqui, nos investigamos a atividade, permeabilidade e ultraestrutura de mitocôndrias em eosinófilos humanos em resposta a estímulos por citocinas pró-inflamatórias [fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); ligante C-C da Quimiocina 5 (CCL-5) ligante C-C da Quimiocina 11 (CCL-11)] e no contexto de doenças inflamatórias intestinais e doenças respiratórias [doença de Crohn (DC); retocolite ulcerativa (RCU) e rinosinusite eosinofílica (RCE)], que são caracterizadas pelo recrutamento e ativação de eosinófilos. A análise foi obtida de eosinófilos isolados do sangue periférico humano de doadores saudáveis estimulados com TNF- α , CCL-5, CCL-11 e analisados com ensaio para os marcadores MitoTracker e MitoSox por citometria de fluxo. Paralelamente, eosinófilos sanguíneos e amostras de biópsia intestinal e do sinus de pacientes com DC, RCU e RCE foram preparados para microscopia eletrônica de transmissão (MET). Eosinófilos teciduais detectados em locais inflamatórios mostrando perfil celular completo, núcleo e membrana plasmática intacta foram investigados. Um total de 84 eosinófilos e 1056 mitocôndrias foram quantificados e os seguintes aspectos mitocondriais foram avaliados: i) Área total mitocondrial, número e tamanho individual; ii) Volume das cristas mitocondriais; iii) Padrão das cristas mitocondriais; e iv) Interações mitocôndria-outras organelas representadas por sítios de contato de membrana ou "theter". Todas as análises quantitativas foram realizadas utilizando o software Fiji. Observamos que a atividade mitocondrial e a permeabilidade de eosinófilos estimulados por TNF- α , CCL-5 e CCL-11 aumentaram significativamente em comparação às células controle. As características ultraestruturais de eosinófilos ativados foram observadas em todos os grupos experimentais em paralelo a mudanças significativas na área total mitocondrial, número, tamanho único, volume das cristas e padrões de cristas representados por diferentes morfologias (lamelar, tubular e mista). Nossas descobertas demonstraram que eosinófilos humanos sofrem remodelação das cristas mitocondriais após estimulação *in vitro* e durante doenças inflamatórias. Além disso, o número de interações interorganelas aumentou durante todas as condições inflamatórias, com interações mitocondriais significativas estabelecidas com retículo endoplasmático (RE), outras mitocôndrias, grânulos secretores, corpúsculos lipídicos (CLs) e vesículas sombrero de eosinófilos (EoSVs). Por fim, identificamos que o padrão de interações mitocondriais mudou de acordo com o microambiente, com sítios de contato mitocôndrias-EoSVs e mitocôndrias-CL detectados apenas em eosinófilos ativados. Em conjunto, nossos achados identificaram que a remodelação e as interações entre mitocôndrias e organelas estão intimamente associadas à ativação de eosinófilos induzida por inflamação e à imunomodulação de suas respostas durante doenças inflamatórias. Esses eventos demonstram que as mitocôndrias dentro dos eosinófilos respondem ao ambiente circundante e podem participar de vias de sinalização que regulam as funções imunológicas dos eosinófilos.

Palavras-chave: eosinófilo; mitocôndria; citocinas; doenças eosinofílicas; inflamação; microscopia eletrônica; citometria de fluxo.

ABSTRACT

The roles played by mitochondria in cells of the immune system has increasingly drawing attention. Mitochondria mediating immune functions and inflammation have been associated with diverse biological processes such as cytokine secretion. However, our current understanding of the mitochondrial activity, architecture and morphological changes in eosinophils under pathological conditions is still poorly known. Here, we investigated the activity, permeability, and ultrastructure of mitochondria within human eosinophils in response to a pro-inflammatory cytokine stimulation [tumor necrosis factor- α (TNF- α); C-C motif chemokine ligand 5 (CCL-5); C-C motif chemokine ligand 11 (CCL-11)], and in the context of inflammatory bowel diseases (IBD) and respiratory diseases [Crohn's disease (CD); ulcerative colitis (UC) and eosinophilic rhinosinusitis (ERS)], which are characterized by recruitment and activation of eosinophils. Analysis was obtained from eosinophils isolated from the human peripheral blood from healthy donors stimulated with TNF- α , CCL-5, CCL-11 and analyzed with MitoTracker and MitoSox assays by flow cytometry. In parallel, blood eosinophils and intestinal and sinus biopsy samples from patients with IBDs and ERS were prepared for transmission electron microscopy (TEM). Tissue eosinophils detected in inflammatory sites showing the entire cell profile, nucleus and intact plasma membrane were investigated with single cell imaging analysis. A total of X eosinophils and X mitochondria were counted and the following mitochondrial aspects were evaluated: i) Mitochondrial total area, number and single size; ii) Mitochondrial cristae volume; iii) Mitochondrial cristae pattern; and iv) Mitochondrial-organelle interactions represented by membrane contact sites or tethers. All quantitative analyses were performed using Fiji software. We observed that mitochondrial activity and permeability of TNF- α , CCL-5 and CCL-11-stimulated eosinophils significantly increased compared to control cells. The ultrastructural signatures of activated eosinophils were observed in all experimental groups in parallel to significant changes in mitochondrial total area, number, single size, cristae volume and cristae patterns represented by different morphologies (lamellar, tubular, and mixed). Our findings demonstrated that human eosinophils undergo mitochondrial cristae reshaping after both in vitro stimulation and during inflammatory diseases. Furthermore, the number of inter-organelle interactions increased during all inflammatory conditions, with significant mitochondrial interactions established with endoplasmic reticulum (ER), other mitochondria, secretory granules, lipid droplets (LDs), and eosinophilic vesicles (EoSVs). Finally, we identified that the pattern of mitochondrial interactions changed according to the microenvironment, with mitochondria-EoSVs and mitochondria-LD contact sites detected only in activated eosinophils. Altogether, our findings identified that mitochondrial remodeling and mitochondria inter-organelle interactions are closely associated with inflammation-induced eosinophil activation and immunomodulation of their responses during inflammatory diseases. These events demonstrate that mitochondria within eosinophils are responsive to the surrounding milieu and may participate in signaling pathways that regulate eosinophil immune functions.

Keywords: eosinophil; mitochondria; cytokines; eosinophilic diseases; inflammation; electron microscopy; flow cytometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ultraestrutura de Mitocôndrias..	21
Figura 2. Funções Gerais de Eosinófilos.....	24
Figura 3. Ultraestrutura do Eosinófilo.....	26
Figura 4. Mecanismos de Secreção de Eosinófilos.	27
Figura 5. Eosinófilo Humano Estimulado com TNF- α em Processo de Secreção por Exocitose Composta.	29
Figura 6. Sinais Ultraestruturais da Desgranulação por Piecemeal.....	30
Figura 7. Ultraestrutura de um Eosinófilo Humano Tecidual em Processo de Citólise.....	32
Figura 8. Características Ultraestruturais In Vivo da ETose Eosinofílica (EETose).....	33
Figura 9. Morfologia Ultraestrutural e Tridimensional (3D) de EoSVs.....	35
Figura 10. Alterações Ultraestruturais Observadas em Eosinófilos Ativados..	36
Figura 11. Representação Esquemática da Ultraestrutura do Eosinófilo	39
Figura 12. Caracterização do Processo de Ativação de Eosinófilos	48
Figura 13. Mitocôndrias Sofrem Alterações Morfológicas e Funcionais em Eosinófilos Estimulados In Vitro.....	51
Figura 14. Análise Ultraestrutural de Mitocôndrias em Doenças Eosinofílicas (Doença de Chron – DC, Retocolite Ulcerativa – RCU e Sinusite Eosinofílica – RCE)..	52
Figura 15. Aspectos Ultraestruturais das Cristas Mitocondriais de Eosinófilos Estimulados In Vitro.....	54
Figura 16. Aspectos Morfológicos das Cristas Mitocondriais de Eosinófilos em Doenças Eosinofílicas.	55
Figura 17. Interações Mitocondriais após a Estimulação In Vitro por TNF- α , CCL5 e CCL11..	57
Figura 18. Interações Mitocondriais em Doenças Eosinofílicas	59

Figura 19. Distribuição das Interações entre Mitocôndrias e Outras Organelas de Eosinófilos Estimulados In Vitro por TNF- α , CCL5 e CCL11.....	61
Figura 20. Distribuição das Interações entre Mitocôndrias e Outras Organelas de Eosinófilos nos Contextos de DC, RCU e RCE	63
Figura 21. Principais Eventos Ocorridos em Mitocôndrias de Eosinófilos Durante o Processo de Ativação Inflamatória.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação de Eosinófilos e Mitocôndrias para as Análises Ultraestruturais.....	44
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Adenosina trifosfato
CCL-5 - Ligante C-C da Quimiocina 5
CCL-11 - Ligante C-C da Quimiocina 11
CL - Corpúsculo lipídico
DC - Doença de Crohn
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DMSO - Dimetilsulfóxido
ECP - Proteína catiônica do eosinófilo
EDN - Neurotoxina derivada do eosinófilo
EoSV - Eosinophil Sombrero Vesicle
EPO - Peroxidase eosinofílica
IFN- γ - Interferon-gama
IL-1 - Interleucina-1
IL-3 - Interleucina-3
IL-4 - Interleucina-4
IL-5 - Interleucina-5
IL-8 - Interleucina-8
H1N1 - Influenza A
GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias
LPS - Lipopolissacarídeo
MBP - Proteína básica principal
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
MV - Microvesículas
PMD - Desgranulação por piecemeal
RCU - Retocolite ulcerativa
RCE - Rinosinusite crônica eosinofílica
RE - Retículo Endoplasmático
RER - Retículo Endoplasmático Rugoso
ROS - Espécie reativa de oxigênio
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
VE - Vesículas extracelular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1. Aspectos Gerais de Mitocôndrias	20
3.2. Estrutura e Função Mitocondrial	20
3.3. Mitocôndrias e o Metabolismo Celular	21
3.4. Mitocôndrias e Células Imunes	22
3.5. Eosinófilos: aspectos gerais	23
3.6. Ultraestrutura de Eosinófilos	23
3.7. Processos Secretores de Eosinófilos	27
3.7.1. Exocitose	27
3.7.2. Desgranulação por Piecemeal (PMD)	29
3.7.3. Citólise	30
3.8. Sistema Vesicular	34
3.9. Contextos de Ativação de Eosinófilos	35
3.9.1. Ativação Celular	35
3.9.2. Eosinófilos no Contexto de Doenças Intestinais	36
3.9.3. Eosinófilos e Sinusite	37
3.9.4. Eosinófilos e Estímulos por Citocinas	38
4. JUSTIFICATIVA	40
5. MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1. Coleta e Isolamento de Eosinófilos do Sangue Periférico	41
5.2. Estímulo por Citocinas	41
5.3. MitoSox e MitoTracker	42

5.4.	Citometria de Fluxo	42
5.5.	Obtenção de Eosinófilos de Pacientes acometidos por doença de Crohn, Colite Ulcerativa e Sinusite	42
5.6.	Microscopia Eletrônica de Transmissão	43
5.7.	Análises Ultraestruturais.....	43
5.7.1	Análises Ultraestruturais Quantitativas.....	44
5.8.	Análises Estatísticas.....	45
6.	RESULTADOS	46
6.1.	Eosinófilos Humanos são Ativados Quando Estimulados com Citocinas Inflamatórias.....	46
6.2.	Mitocôndrias Sofrem Alterações Funcionais e Ultraestruturais em Eosinófilos Estimulados In Vitro	49
6.3.	Mitocôndrias de Eosinófilos Sofrem Alteração de Padrão de Crista. 53	
6.4.	A Ativação de Eosinófilos Induz Interação de Mitocôndrias com Outras Organelas Celulares	55
6.5.	A Proporção de Interação de Mitocôndrias com Outras Organelas se Altera de Acordo com o Contexto de Ativação de Eosinófilos	60
7.	DISCUSSÃO	65
8.	CONCLUSÃO	69
9.	REFERÊNCIAS	71
10.	ANEXOS	77
10.1	Publicações Relacionadas a Tese	77

1 INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelas multifuncionais com uma arquitetura conectada com as funções celulares. As mitocôndrias podem mudar sua estrutura em coordenação com processos celulares fisiológicos e patológicos e essas alterações influenciam uma infinidade de vias de sinalização celular, como bioenergética (Galloway, Lee et al. 2012), termorregulação (Mota-Rojas, Titto et al. 2021), apoptose (Biswal, Panda et al. 2025) e destino celular (Bahat, MacVicar et al. 2021). As mitocôndrias são organelas que possuem alta plasticidade com capacidade de adaptação às diversas funções e necessidades da célula. Para isso, essas organelas alteram a sua resposta metabólica (de acordo com o microambiente), a morfologia de superfície e o padrão de cristas e estabelecem contatos de membrana com outras organelas [revisado em (Galloway, Lee et al. 2012, Chen and Chan 2017)]. Todos esses aspectos estão relacionados com a dinâmica mitocondrial, termo que se refere a eventos estruturais de remodelação mitocondrial envolvendo tamanho, forma, atividade, tráfego e interações com outras organelas dentro do citoplasma da célula (Cervantes-Silva, Cox et al. 2021).

Um crescente número de estudos mostram o papel dessas organelas na regulação da resposta de células imunes em situações de ativação celular associadas ao estresse celular (Breda, Davanzo et al. 2019). Atuando como sensores celulares, as mitocôndrias são consideradas organelas sinalizadoras e reguladoras imunológicas das imunidades inata e adaptativa em contextos de doenças autoimunes, infecciosas e inflamatórias (Sena, Li et al. 2013, Iwasaki, Takeshima et al. 2020). No contexto da imunidade adaptativa, conhecemos em parte o papel das mitocôndrias em linfócitos. Nessas células, durante o processo de ativação celular, ocorre a indução da remodelação das cristas que regula o metabolismo (Buck, O'Sullivan et al. 2016). Na imunidade inata, vários estudos demonstraram alterações complexas no metabolismo mitocondrial em resposta à estímulos variados em macrófagos *in vitro* (Mills, Kelly et al. 2016). Por exemplo, em macrófagos ativados por lipopolissacarídeos (LPS) e interferon-gama (IFN- γ), há diminuição da respiração e quebra do ciclo de Krebs (Mills, Kelly et al. 2016). Mitocôndrias atuam também na biologia de granulócitos. Em neutrófilos, essas organelas têm influência desde o desenvolvimento até a quimiotaxia, em sua função

efetora e na morte celular (Glover, Schreiner et al. 2024). Além disso, as mitocôndrias e os componentes mitocondriais, como o DNA mitocondrial, podem ser liberados pelos neutrófilos para eliminar a infecção e/ou moldar a resposta imune, dependendo do contexto específico (Vorobjeva, Chelombitko et al. 2023).

Em relação a outros granulócitos, como os eosinófilos, pouco se conhece sobre o papel das mitocôndrias na biologia dessas células. Mitocôndrias parecem estar envolvidas na morte programada de eosinófilos a partir da regulação por citocinas como interleucina-5 (IL-5) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) que promovem a inibição da via intrínseca de apoptose por modulação mitocondrial (Peachman, Lyles et al. 2001). Em modelos experimentais, dados do nosso grupo mostraram que doenças inflamatórias como influenza A (H1N1), asma e esquistossomose mansoni induzem remodelamento da morfologia mitocondrial (Cervantes-Silva, Cox et al. 2021, Bonjour, Palazzi et al. 2022). Além disso, observamos que durante a maturação de eosinófilos, ocorre significativa redução do número de mitocôndrias (Bonjour, Palazzi, 2022). Essa redução da população mitocondrial, somada às alterações de morfologia mitocondrial em eosinófilos, apontam para um papel adaptativo dessas organelas a situações de homeostasia e estresse celular (Robin and Wong 1988, Bonjour, Palazzi et al. 2022, Koranteng, Chung et al. 2024).

Em humanos, poucos estudos foram feitos afim de avaliar o papel de mitocôndrias em eosinófilos. Sabe-se que, em contextos de ativação, as mitocôndrias têm um papel relevante na regulação da sobrevivência celular, além do papel tradicional no controle do metabolismo (Peachman, Lyles et al. 2001). Outro aspecto já investigado é o perfil metabólico de mitocôndrias em eosinófilos humanos apontando predominância do perfil oxidativo em relação ao glicolítico (Porter, Toepfner et al. 2018). No entanto, muitos outros aspectos a respeito do papel dessas organelas em eosinófilos ainda não foram elucidados, principalmente durante doenças humanas.

Dentre as doenças com grande influxo de eosinófilos destacam-se as doenças gastrointestinais como a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU) e doenças do trato respiratório, como a rinossinusite crônica eosinofílica (RSCE) (Katsanos, Zinovieva et al. 2011, Shah, Ishinaga et al. 2016). Essas doenças são caracterizadas por uma resposta inflamatória eosinofílica com

produção acentuada de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Ligante C-C da Quimiocina 5 (CCL5), Ligante C-C da Quimiocina 11 (CCL11), além de outras citocinas (Oliveira and Lukacs 2003, Hogan, Rothenberg et al. 2004). A resposta mitocondrial dos eosinófilos humanos no contexto dessas doenças, assim como à estímulos inflamatórios in vitro, ainda não é conhecida.

O presente estudo busca compreender melhor o comportamento das mitocôndrias de eosinófilos humanos em resposta à ativação por citocinas pró-inflamatórias e em doenças inflamatórias intestinais e do trato respiratório.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a morfologia, a dinâmica e o metabolismo da população mitocondrial de eosinófilos humanos em resposta à inflamação (estímulos in vitro e doenças inflamatórias eosinofílicas).

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Caracterizar padrões morfológicos ultraestruturais indicadores da ativação de eosinófilos isolados do sangue periférico humano e estimulados in vitro com citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , CCL11, CCL5 e IL-5);

2.2.2 Avaliar a permeabilidade de membrana mitocondrial e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por mitocôndrias de eosinófilos isolados do sangue periférico e estimulados in vitro conforme acima;

2.2.3 Investigar o número e a ultraestrutura mitocondrial de eosinófilos ativados in vitro com citocinas pró-inflamatórias e em tecidos durante doenças eosinofílicas (biópsias humanas de DC, RCU e RSE);

2.2.4 Analisar aspectos qualitativos e quantitativos da morfologia das cristas mitocondriais em diferentes microambientes teciduais nos contextos da ativação in vitro e das doenças eosinofílicas citadas acima;

2.2.5 Avaliar a interação entre mitocôndrias e outras organelas de eosinófilos nas situações in vitro e ex-vivo acima mencionadas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos Gerais de Mitocôndrias

As mitocôndrias são classicamente conhecidas por sua função de gerar ATP, mas também possuem papel crucial em vários processos celulares, como o controle do cálcio intracelular, a regulação da morte celular programada (apoptose) e a produção de ROS (Faas and De Vos 2020).

Mitocôndrias são organelas pleomórficas e semiautônomas, capazes de alterar sua forma (comprimento, largura, circularidade) e ultraestrutura de acordo com o contexto celular (Giacomello, Pyakurel et al. 2020). Essas organelas dinâmicas são capazes de estabelecer uma rede com outros compartimentos celulares, como organelas secretoras (retículo endoplasmático, complexo de Golgi), outras mitocôndrias e em células imunes com grânulos específicos (Bonjour, 2022). Esses processos mitocondriais estão associados à regulação e mecanismo de sobrevivência celular em muitos processos homeostáticos e patológicos estritamente associados às respostas imunes (Madan, Uttekar et al. 2022).

3.2 Estrutura e Função Mitocondrial

As mitocôndrias possuem ultraestrutura complexa, sendo delimitadas por uma dupla membrana lipídica, com dobramentos da membrana interna formando as estruturas conhecidas como cristas (Figura 1), que apresentam número e forma variáveis nos diversos tipos celulares, e um espaço entre as cristas onde se localiza a matriz mitocondrial (Vincent, Grady et al. 2016).

As membranas mitocondriais diferenciam-se na composição lipídica sendo funcional e estruturalmente diferentes entre si. Da composição fosfolipídica total, a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina são os principais fosfolipídios que correspondem a cerca de 80% dos fosfolipídios totais (Horvath and Daum 2013).

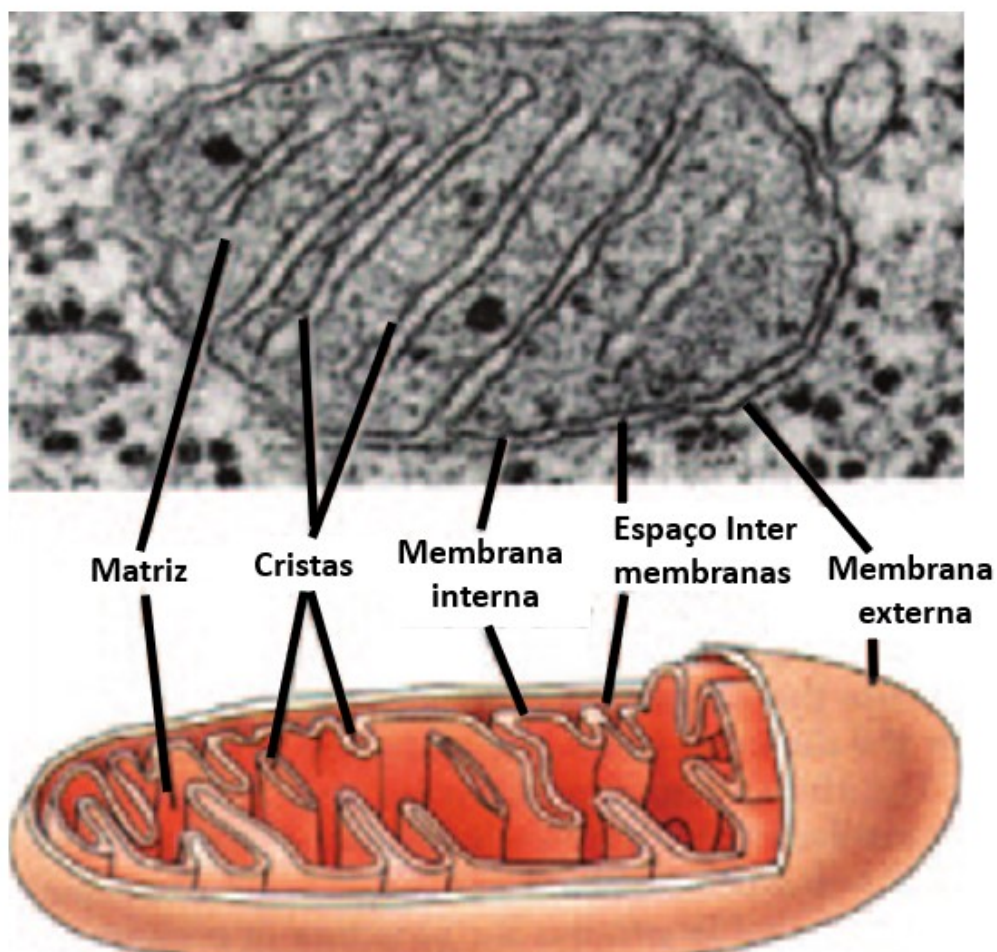


Figura 1. Ultraestrutura de Mitocôndrias. Ultraestrutura típica de uma mitocôndria de célula saudável. Mitocôndrias contêm cristas elaboradas caracterizadas por extensões da membrana interna e complexos de proteínas da cadeia de transporte de elétrons necessários para produzir ATP. Adaptado de (Seyfried, Flores et al. 2014).

3.3 Mitocôndrias e o Metabolismo Celular

Além da produção de energia, as mitocôndrias apresentam um papel importante na biossíntese de lipídios, modulação do estresse e do controle metabólico da célula (Breda, Davanzo et al. 2019). Alterações na função mitocondrial estão associadas a uma ampla gama de distúrbios metabólicos, neurodegenerativos e cardiovasculares como a neuropatia óptica e a síndrome de Leigh (Haas and Zolkipli 2014).

3.4 Mitocôndrias e Células Imunes

Nas últimas décadas, surgiram evidências sugerindo um papel vital para as mitocôndrias na modulação do sistema imunológico (Trinchese, Cimmino et al. 2024). Estudos demonstram que as mitocôndrias não apenas influenciam os processos bioenergéticos das células imunes, mas também modulam as respostas imunes através de sinais intracelulares que afetam a ativação e a diferenciação de tais células (Su, Wang et al. 2021, Vorobjeva, Chelombitko et al. 2023). Células como linfócitos, macrófagos e células dendríticas dependem das mitocôndrias para regular a produção de energia necessária para a ativação, proliferação e diferenciação durante uma resposta imunológica (Mills, Kelly et al. 2016). A função mitocondrial é especialmente crítica durante infecções ou processos inflamatórios, onde a produção de ATP e o controle do estresse oxidativo são essenciais para o bom desempenho imune (Marchi, Guilbaud et al. 2023). O metabolismo celular das células imunes, incluindo o processo de glicólise, respiração mitocondrial e utilização de ácidos graxos, afeta a função imunológica (Patergnani, Bouhamida et al. 2021). Em condições inflamatórias, como nas doenças autoimunes ou durante a resposta a infecções, o metabolismo das mitocôndrias é alterado para fornecer energia suficiente às células imunes ativadas (Bahat, MacVicar et al. 2021).

A mudança no metabolismo também influencia no processo de inflamação como em uma resposta imunológica vital à infecção ou lesão tecidual mediada por citocinas inflamatórias (Marchi, Guilbaud et al. 2023). No entanto, a inflamação crônica está associada a várias doenças, como a DC e a RCU. Foi visto ainda que, em resposta a estímulos inflamatórios, as células imunes sofrem mudanças notáveis na morfologia e função mitocondrial. Por exemplo, é observado aumento da produção de ROS, o que pode afetar a integridade mitocondrial e levar ao estresse oxidativo (Jenkins, Neikirk et al. 2024).

Além disso, adaptações observadas no metabolismo celular oferece suporte para sustentar o importante papel inflamatório dessas organelas em contextos de ativação (Marchi, Guilbaud et al. 2023). Esta reprogramação metabólica é essencial para a sua sobrevivência e função no microambiente do tecido inflamado. Adicionalmente, alterações ultraestruturais mitocondriais podem modular as demandas energéticas e funcionais durante a inflamação (Breda, Davanzo et al.

2019). As alterações no metabolismo mitocondrial sob condições inflamatórias foram descritas em diversas células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Mills, Kelly et al. 2016, Cao, Zhao et al. 2022, Zhang, Zhang et al. 2022). Contudo, nos eosinófilos, estas alterações são pouco compreendidas, conforme discutido abaixo.

3.5 Eosinófilos: aspectos gerais

Eosinófilos são células que, assim como neutrófilos e basófilos, são classificadas como granulócitos. Como a característica morfológica mais marcante dos eosinófilos, estão os grandes grânulos citoplasmáticos que despertaram interesse científico desde meados do século XIX, quando, usando um microscópio composto, pesquisadores pioneiros (Gluge, Vogel e WhartonJones) descreveram pela primeira vez “células sanguíneas granulares”, “células grosseiramente granulares” e “glóbulos inflamatórios” em exsudatos, sangue, escarro e tecido doente (Melo and e Rothenberg 2025).

Essas células são oriundas da medula óssea e distinguem-se por sua morfologia característica apresentando cor significativamente rosada em microscopia de luz devido a alta afinidade com o corante eosina (Weller and Spencer 2017). Essa célula está presente em 3-5% do total de células do sangue e está associada a processos de doenças distintas que incluem infecções parasitárias helmínticas, doenças alérgicas e intestinais além de uma variedade de outras doenças com causas menos definidas, como hipereosinofilias secundárias (Hogan, Rothenberg et al. 2004, Klion, Ackerman et al. 2020). No entanto, estudos recentes ampliam os papéis dessa célula tornando-a um granulócito multifuncional envolvido em diversos processos homeostáticos, uma vez que essa célula já está reconhecidamente associada ao reparo tecidual, mediação de células imunes, metabolismo tecidual, imunidade humoral e desenvolvimento de estruturas como as glândulas mamárias (Figura 2) (Weller and Spencer 2017).

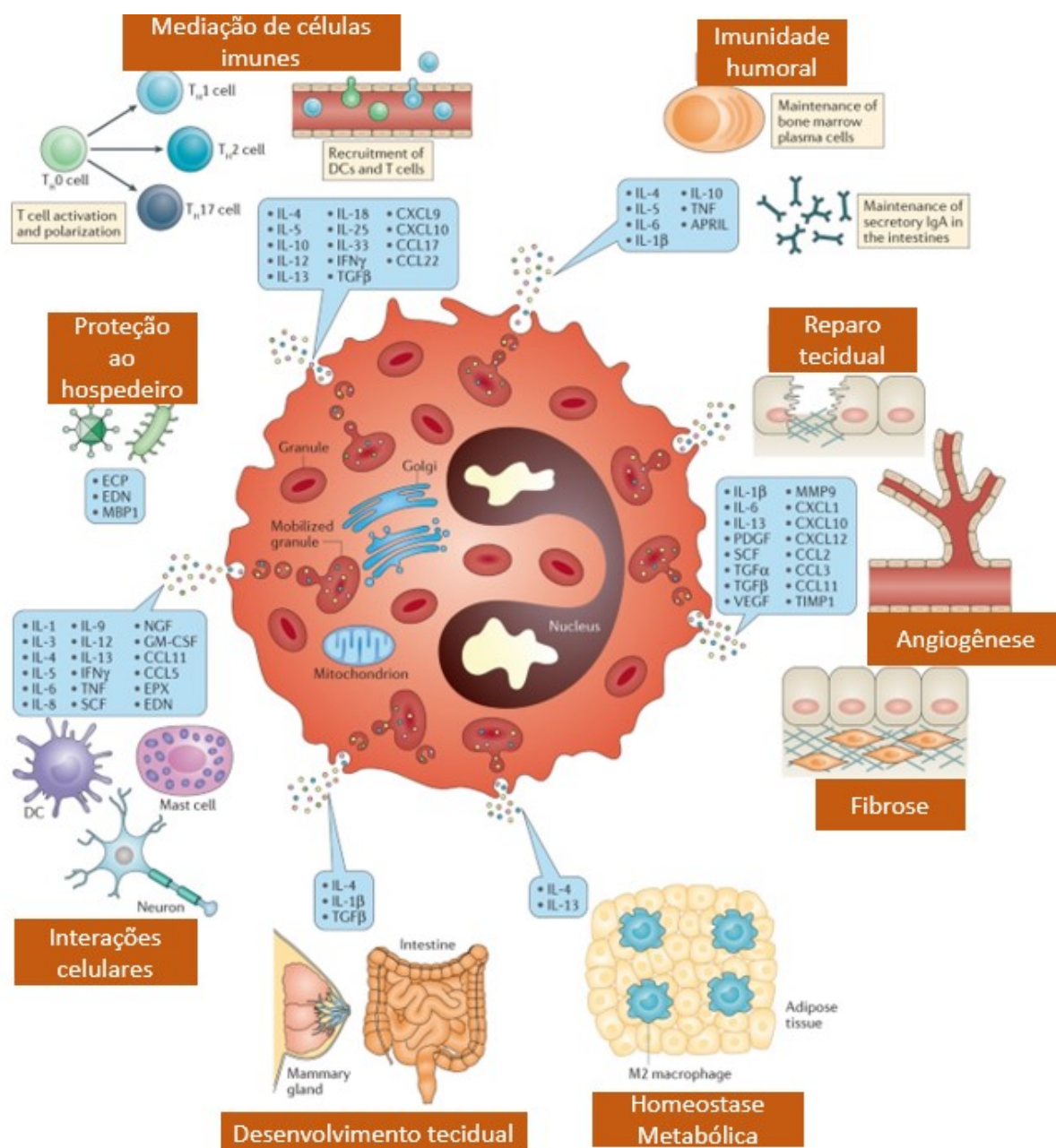


Figura 2. Funções Gerais de Eosinófilos. No quadro, um resumo dos mediadores derivados de eosinófilos e suas funções. Os eosinófilos são uma fonte de mediadores lipídicos, proteínas catiônicas derivadas de grânulos e um grande número de quimiocinas e citocinas (muitas das quais são armazenadas pré-formadas dentro de grânulos intracelulares de eosinófilos) que têm efeitos abrangentes na saúde e na doença. Adaptado de (Weller and Spencer 2017).

3.6 Ultraestrutura de Eosinófilos

Eosinófilos são notavelmente conhecidos pela sua morfologia característica, facilmente reconhecidos por microscopia eletrônica. Eles apresentam um núcleo predominantemente bilobulado em humanos e uma população de

grânulos secretores, também denominados de grânulos específicos (Figura 3), que se dividem em duas regiões, uma matriz elétron-lúcida contendo proteínas, como peroxidase eosinofílica (EPO), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) e um cristalóide elétron-denso contendo proteína básica principal (MBP), a proteína catiônica mais abundante de grânulos de eosinófilos (Melo, Dvorak et al. 2022). Além das proteínas catiônicas, os grânulos secretores de eosinófilos armazenam inúmeros mediadores imunes, como citocinas e quimiocinas (Melo et al., 2013). Os grânulos, pela sua morfologia única, são facilmente identificáveis e ocupam boa parte do citoplasma dos eosinófilos. Estima-se que um eosinófilo maduro possua em torno de 200 grânulos funcionais (Figura 4) (Miyabe, Kobayashi et al. 2021). Interessantemente, nosso grupo demonstrou que os grânulos secretores de eosinófilos não são simples contêineres de armazenamento de moléculas, mas estruturas complexas, compartimentalizadas e contendo membranas internas (Fig. 3) (Melo, Perez et al. 2005); Melo et al, 2022).

Duas outras organelas são encontradas no citoplasma de eosinófilos e consideradas típicas dessas células: os corpúsculos lipídicos (CLs), também conhecidos como gotículas lipídicas, (Melo and Weller 2014) e as vesículas sombrero (EoSVs, do inglês *Eosinophil Sombrero Vesicles*), vesículas identificadas por ultraestrutura característica comum as diferentes formas de secreção (Melo, Spencer et al. 2008).

Em contextos patológicos, é possível observar um aumento da presença de CLs que armazenam mediadores pró-inflamatórios (Melo and Weller 2014) e de vesículas sombrero de eosinófilos (EoSVs) que carregam produtos dos grânulos para outras partes do citoplasma e para o exterior da célula, um indicativo da responsividade de eosinófilos em contextos inflamatórios (Melo, Spencer et al. 2008).

Destaca-se ainda que junto com organelas clássicas de secreção como complexo de Golgi e retículo endoplasmático há ainda, o importante papel dos grânulos secretores, que não só ajudam no reconhecimento do eosinófilo nas observações por ultraestrutura com também tem papel relevante na secreção celular de eosinófilos.

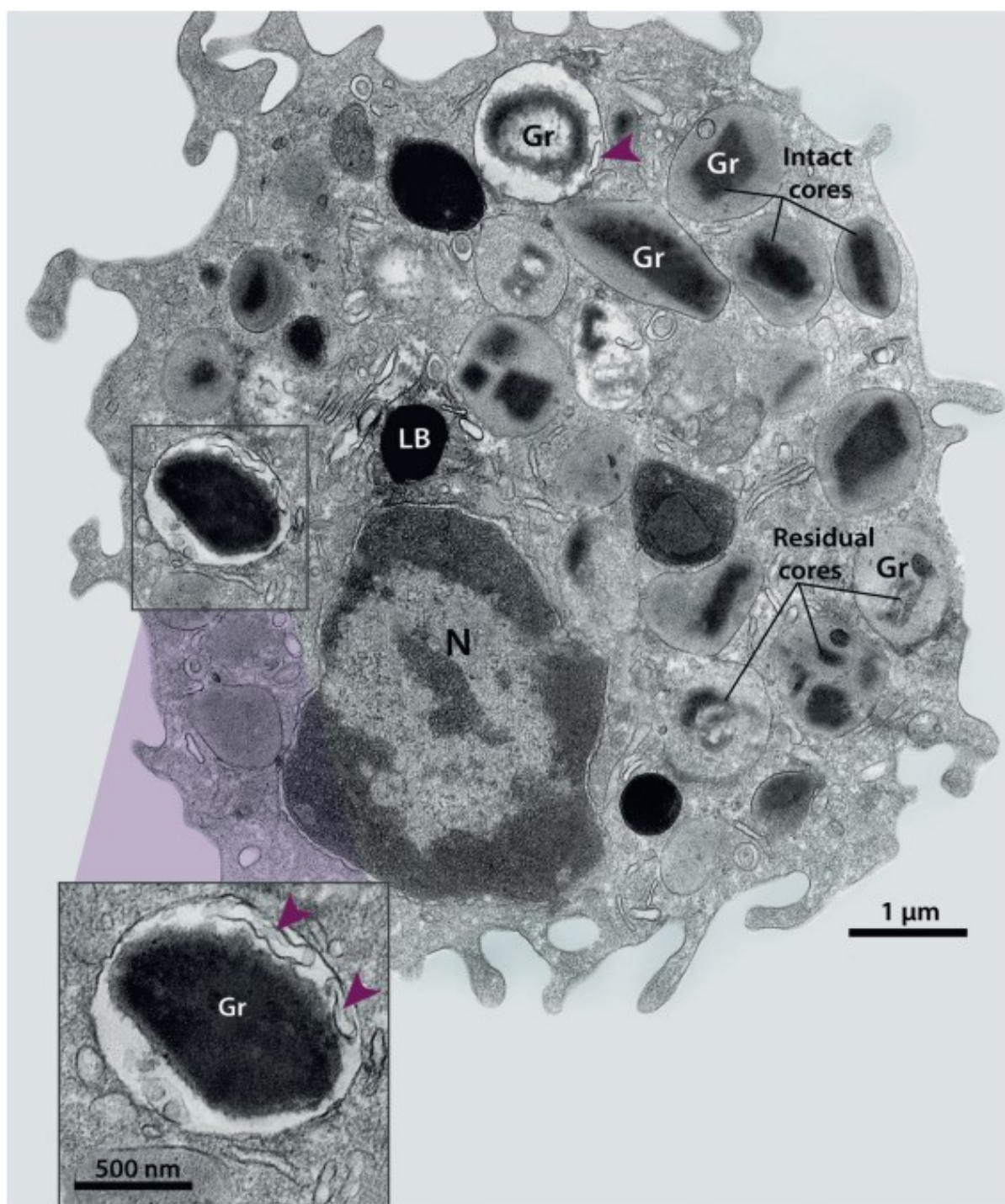


Figura 3. Ultraestrutura de Eosinófilos. Eosinófilo humano do sangue periférico, mostrando a distribuição dos grânulos pelo citoplasma da célula e o núcleo excêntrico e bilobulado. No detalhe observe os grânulos com cristalóide reverso. Observe ainda as cabeças de seta apontando para a membranas internas dos grânulos. Gr, grânulo; N, núcleo e CL, corpúsculo lipídico. Adaptada de (Melo, Dvorak et al, 2022)

3.7 Processos Secretores de Eosinófilos

A secreção é um processo celular fundamental para diferentes eventos fisiológicos e patológicos. Em células do sistema imune humano, como os eosinófilos, esse processo é essencial para o funcionamento e a responsividade celular em diferentes contextos, sendo realizado por meio dos grânulos secretores específicos (Melo e Rothenberg, 2024).

Para liberação de seus produtos eosinófilos podem realizar diferentes tipos de secreção: (i) exocitose clássica, (ii) exocitose composta, (iii) desgranulação por piecemeal (PMD) e (iv) citólise (Figura 4B).

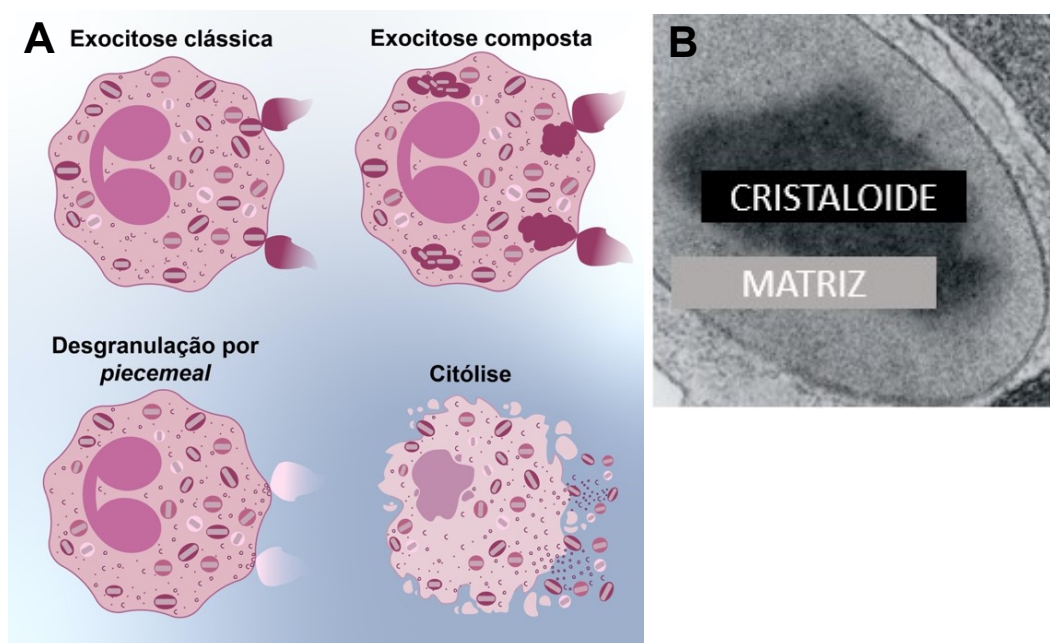


Figura 4. Mecanismos de Secreção de Eosinófilos. (A) Os eosinófilos podem secretar suas proteínas granulares por exocitose clássica (fusão de grânulos individuais com a membrana plasmática e liberação do conteúdo total dos grânulos); exocitose composta (fusão grânulo-grânulo intracelular antes da liberação extracelular); desgranulação por piecemeal (transporte vesicular de pequenas porções de materiais dos grânulos secretores para a superfície celular); e/ou citólise (deposição extracelular de grânulos intactos após a lise celular). (B) Ultraestrutura de um grânulo secretor. O cristalóide aparece como área central elétron-densa na qual se localiza a proteína MBP e a matriz como uma região elétron-lúcida local onde se localizam proteínas como EPO, EDN e ECP. Adaptado de (Melo, Dvorak et al. 2022, Barata 2024).

3.7.1 Exocitose

A exocitose é um processo secretor que consiste principalmente na liberação do conteúdo dos grânulos para o meio extracelular e pode ser classificado

de duas formas: exocitose clássica e exocitose composta (Spencer, Bonjour et al. 2014). Esse mecanismo de secreção é pouco frequente em eosinófilos participando de doenças in vivo.

A exocitose clássica é um sistema secretor no qual um único grânulo intracelular se funde individualmente com a membrana plasmática e libera todo o seu conteúdo extracelularmente por meio de um poro secretor (Miyabe, Kobayashi et al. 2021). Nesse contexto, ocorre uma sequência ordenada e coordenada de eventos que culminam na liberação do conteúdo granular. Inicialmente, ocorre migração massiva de grânulos para a região periférica da célula, próxima à região de membrana plasmática, com eventos de fusão grânulo-membrana., seguidos de liberação do conteúdo granular (Logan, Lacy et al. 2002). A exocitose composta, por outro lado, consiste na fusão de uma população de grânulos que formará câmaras no interior do citoplasma (Figura 5). As células, então, secretam todo o conteúdo intragranular desses múltiplos grânulos para o meio extracelular. Durante esse processo, observa-se uma intensa perda de elétron-densidade dos grânulos sob microscopia eletrônica, acompanhada de desorganização estrutural interna (Melo, Dvorak et al. 2022).

Esse processo já foi observado em eosinófilos envolvidos em doenças parasitárias como a esquistossomose e a strongiloidíase, além de observações in vitro a partir de estímulos com proteínas pró-inflamatórias, como o TNF- α (Carmo, Bonjour et al. 2016, Miyabe, Kobayashi et al. 2021, Melo, Dvorak et al. 2022).

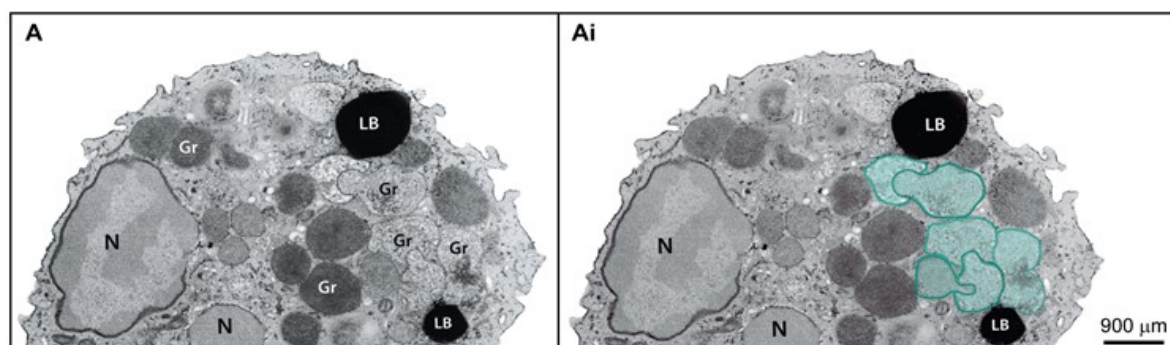


Figura 5. Eosinófilo Humano Estimulado com $\text{TNF-}\alpha$ em Processo de Secreção por Exocitose Composta. (A) e (Ai) Grânulos secretores (Gr) encontram-se fundidos entre si, característica marcante do processo de exocitose composta (marcação verde em Ai). N, núcleo; LB, corpúsculo lipídico (*lipid body*, em inglês). Imagem obtida ao microscópio eletrônico de transmissão. Adaptado de (Melo, Dvorak et al. 2022).

3.7.2 Desgranulação por Piecemeal

A degranulação por piecemeal constitui um dos principais processos de secreção realizado pelos eosinófilos *in vivo*. Esse mecanismo secretor é considerado uma via secretora não convencional, uma vez que é mediada pelo transporte vesicular. Essa secreção consiste na liberação seletiva e gradativa do conteúdo dos grânulos que são mobilizados e armazenados em vesículas do tipo EoSVs (Melo, Spencer et al. 2008, Spencer, Bonjour et al. 2014). As EoSVs tubulares expressam cadeias de receptores de citocina nas quais se ligam algumas interleucinas como a 4 (IL-4). Essas vesículas se fundem com a membrana plasmática e liberam seus conteúdos derivados dos grânulos em espaços extracelulares de forma regulada (Melo and Weller 2010).

Ultraestruturalmente, esse processo pode ser visualizado através da perda de elétron-densidade dos grânulos (Figura 6), decorrente do esvaziamento gradual de seus conteúdos que são liberados ao meio, carregado por vesículas (Melo and Weller 2010, Melo, Dvorak et al. 2022). Os níveis de mobilização e esvaziamento dos grânulos podem variar nesse processo e vários sinais clássicos estão associados a esse tipo de secreção. Inicialmente se observa uma perda de estrutura do cristalóide central (Figura 6A, B), em alguns casos resultando em perda completa dessa estrutura e em outros casos ainda é possível observar resquícios do cristalóide, que são comumente chamados de cristalóide residual (Figura 6B).

Observa-se a ainda a matriz do grânulo elétron-lúcida pela perda de conteúdos que ocorre durante o processo (Figura 6C) (Melo, Dvorak et al. 2022).

Por conta desse processo de liberação gradual de conteúdo dos grânulos, o termo em inglês “piece by piece” foi cunhado para se referir ao processo, resultando no nome “desgranulação por piecemeal” (Melo; Weller, 2010). A ocorrência deste processo tem sido identificado em diversos estudos *in vivo* sob condições inflamatórias em eosinófilos humanos, incluindo sinusite (Shahana, Björnsson et al. 2005), colite ulcerativa (RCU), doença de Crohn (DC),(Erjefalt, Greiff et al.,2005), pólipos nasal (Armengot; Garín; Carda, 2009), asma (Shahana *et al.*, 2005), rinite alérgica (Malm-Erjefalt *et al.*, 2005), dermatite atópica (Malm-Erjefalt *et al.*, 2005), carcinoma gástrico (Caruso, Irato, Rigoli, 2022) e cólera (Qadri, 2004).

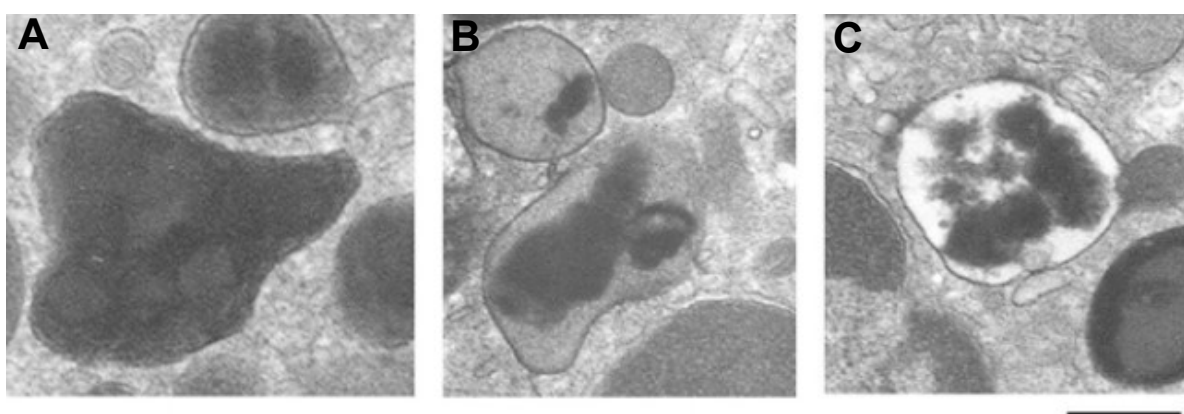


Figura 6. Sinais Ultraestruturais da Desgranulação por Piecemeal. (A) Desestruturação do cristalóide e aumento do volume do grânulo. (B) Alteração do formato do cristalóide e perda do conteúdo dos grânulos. (C) Desestruturação e perda da elétron-densidade. Barra: 1µm. Adaptado de (Melo, Dvorak et al. 2022).

3.7.3 Citólise

A citólise em eosinófilos é um processo de morte celular que se caracteriza pela descondensação de cromatina, perda de organelas e rompimento da membrana plasmática celular, seguida pela deposição dos grânulos secretores na matriz extracelular (Thompson-Souza et al. 2022; Melo et al. 2022). Desta forma, em eosinófilos, a citólise é reconhecida como um mecanismo secretor comumente encontrado em tecidos de biópsias e secreções em diferentes doenças associadas a eosinófilos, como asma, rinite, esofagite eosinofílica, RCU, DC, dentre outras (Figura 7) (Miyabe, Kobayashi et al. 2021, Melo, Dvorak et al. 2022).

Uma característica notável desse processo secretor é o fato dos grânulos depositados nos sítios inflamatórios se encontrarem intactos e ativos, isto é, com capacidade de liberar seus conteúdos no meio extracelular mesmo após a morte celular. Estes grânulos são chamados de FEGs (grânulos livres de eosinófilos; *free eosinophil granules*, em inglês) e vêm sendo descritos em inúmeras doenças há décadas. FEGs podem funcionar como organelas independentes e liberar seletivamente seu conteúdo nos tecidos (Persson and Uller 2014). Esses grânulos, por serem funcionais, são capazes de ativar mecanismos chamados de “*Cluster Bombs*” que exacerbam a resposta inflamatória local no tecido circundante da célula em citólise (Neves, 2013). Um trabalho do nosso grupo demonstrou recentemente que, além de grânulos intactos, a citólise também libera EoSVs que permanecem intactas e depositadas no tecido, passando a atuar como vesículas extracelulares (Neves, 2024).

Em 2013, foi demonstrado pela primeira vez que a morte por citólise pode vir acompanhada da extrusão extracelular de armadilhas de DNA de origem nuclear, semelhante ao que ocorre em neutrófilos (NETose), associada à liberação de grânulos intactos no tecido. O processo de morte celular de eosinófilos com liberação dessas armadilhas é denominado de ETose (Ueki et al., 2013). Recentemente, nosso grupo identificou uma “assinatura ultraestrutural” da ETose de eosinófilos, ou seja, toda a sequência desse processo, visto por microscopia eletrônica de transmissão (MET), com os sinais clássicos que marcam o início da ETose, considerados eventos canônicos para o processo (Neves 2022) (Figura 8).

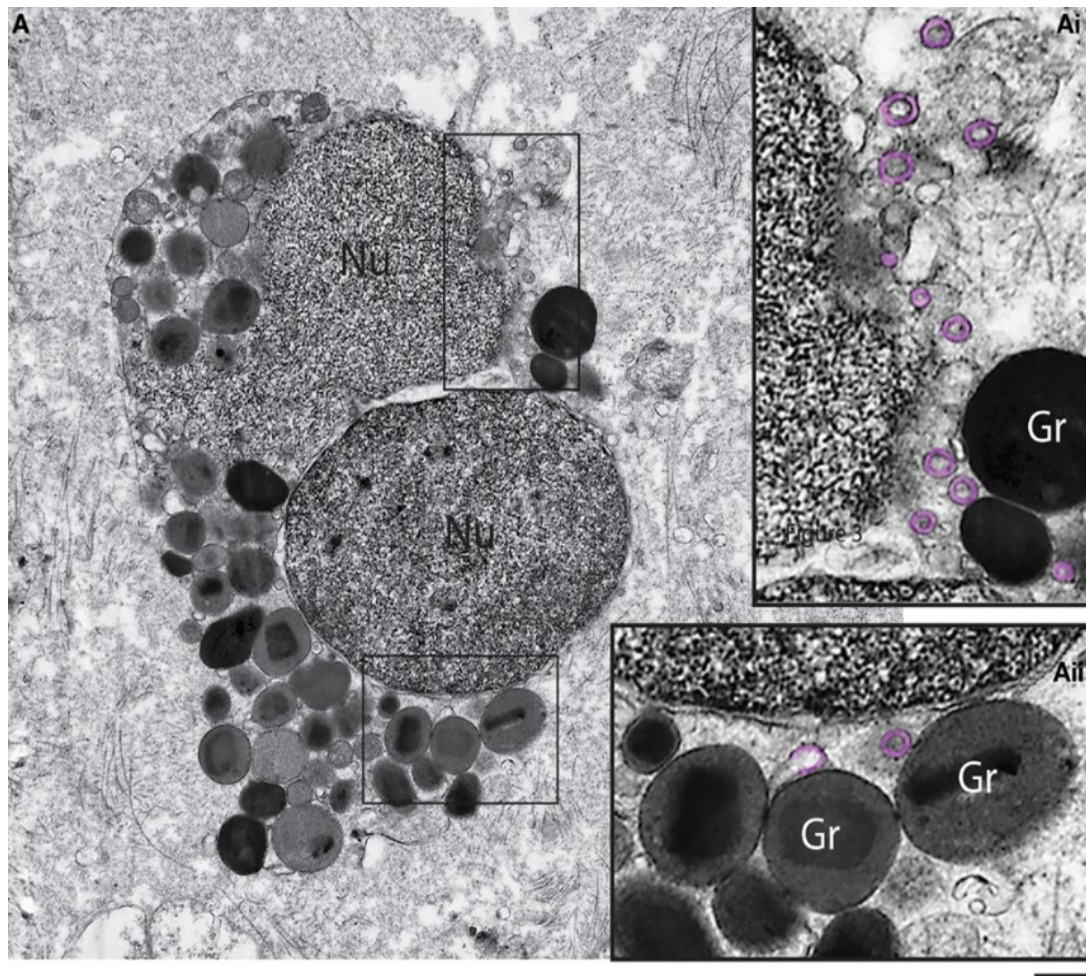


Figura 7. Ultraestrutura de um Eosinófilo Humano Tecidual em Processo de Citólise. (A) Observe o núcleo em desintegração e os grânulos secretores livres extracelulares no tecido circundante. (Ai e Aii) Observe a presença de EoSs livres e intactas (destacadas em rosa) no tecido, após a lise celular. Barra de escala: (A) 800 nm; (Ai e Aii) 300 nm. Nu, núcleo; Gr, grânulo secretor. Adaptado de (Spencer, Bonjour et al. 2014).

Os eventos iniciais que ocorrem antes da liberação das armadilhas de DNA são caracterizados por descondensação acentuada da cromatina, perda do aspecto bilobulado e arredondamento nuclear. Nessa fase, toda a cromatina é visualizada somente como eucromatina. Os eventos posteriores são caracterizados por ruptura do envoltório nuclear o que resulta na dispersão da cromatina no citoplasma e subsequente liberação da cromatina na matriz extracelular após a ruptura da membrana plasmática. Assim, a cromatina descondensada emerge dos eosinófilos em processo de morte, sendo liberada como fibras de complexo de DNA e histona (Figura 8).

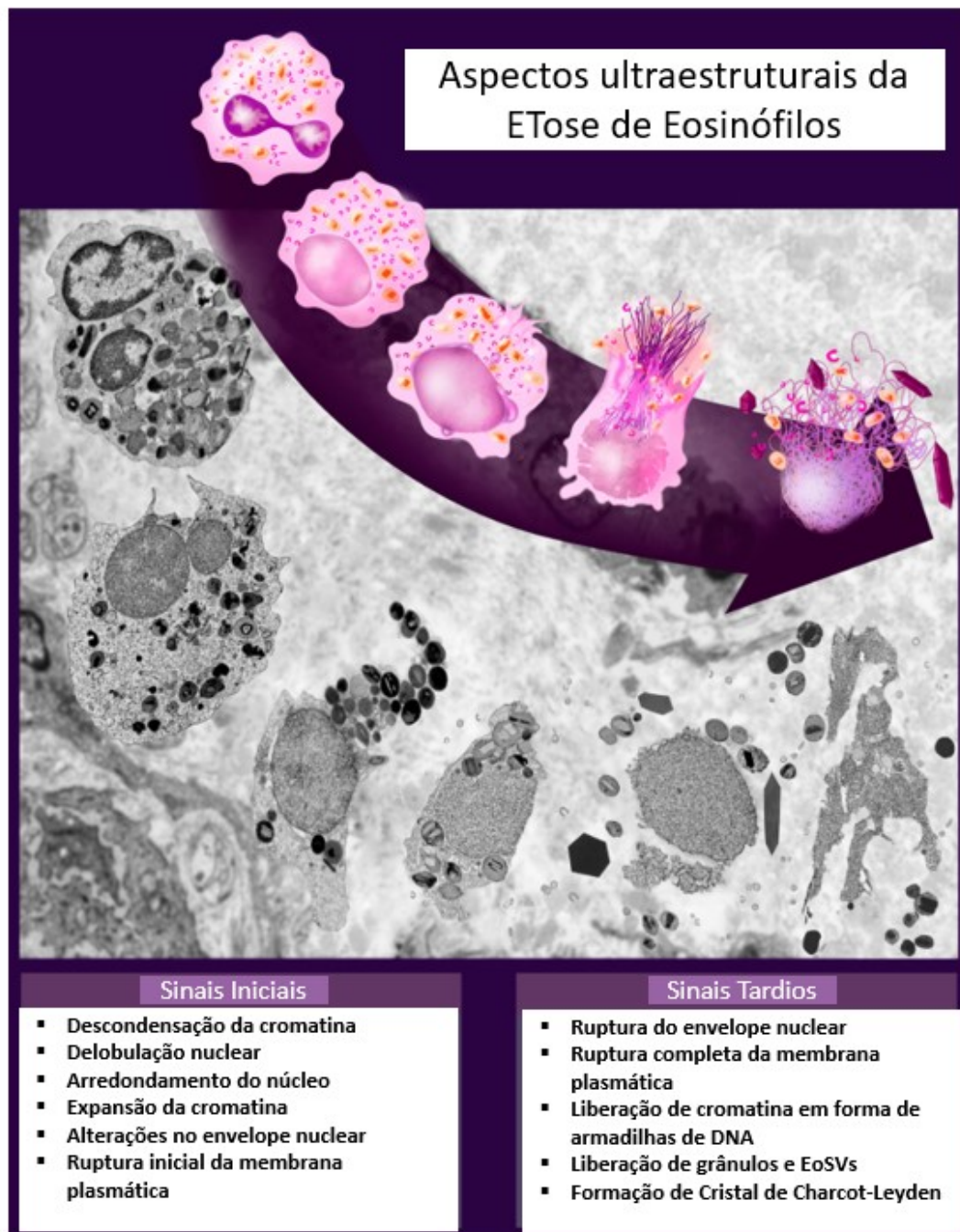


Figura 8: Características Ultraestruturais In Vivo da ETose Eosinofílica (EETose)

Observação em tecidos durante doenças inflamatórias humanas associadas a eosinófilos. A EETose é caracterizada por sinais precoces e tardios, que compõem uma assinatura ultraestrutural por MET. Alterações nucleares marcantes e a ruptura inicial da membrana plasmática (MP) indicam sinais precoces de EETose. O envoltório nuclear pode apresentar alterações estruturais (vesiculação e alargamento do espaço perinuclear entre as membranas nucleares externa e interna). Eosinófilos na ETose tardia apresentam ruptura completa da MP, ruptura do envoltório nuclear e liberação de grânulos secretores e EoSVs, juntamente com cromatina disseminada, observada como armadilhas extracelulares (ETs). Cristais de Charcot-Leyden (CLCs) são frequentemente associados à EETose

3.8 Sistema Vesicular

Os eosinófilos armazenam e secretam uma variedade de mediadores inflamatórios, como quimiocinas e interleucinas, e para transportar essas substâncias, a célula libera diferentes tipos de estruturas nanométricas ligadas à membrana, coletivamente denominadas vesículas extracelulares (VEs). Essas vesículas têm a capacidade de transportar mediadores imunológicos específicos, denotando assim a complexidade dos mecanismos secretores dos eosinófilos (Akuthota, Carmo et al. 2016). Em eosinófilos humanos, exossomos derivados de endossomos, microvesículas/MVs derivadas de membrana plasmática e EoSVs derivadas de grânulos secretores (Figura 9) podem atuar como EVs associadas à respostas inflamatórias (Rodrigo-Muñoz, Gil-Martínez et al. 2024, Weihrauch, Melo et al. 2024).

Dentre os vários tipos vesiculares, merecem destaque as EoSVs, pois são grandes transportadores vesículo-tubulares, que estão presentes no citoplasma de eosinófilos humanos e envolvidas no transporte de mediadores imunológicos (Figura 9A) (Melo, Spencer et al. 2008, Melo, Spencer et al. 2009). Devido à sua morfologia típica, as EoSVs são facilmente identificadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As EoSVs têm um diâmetro de 150–300 nm e foram nomeadas devido à sua semelhança estrutural com um chapéu mexicano chamado de “*Sombrero*”, embora também possam assumir uma morfologia alongada em forma de halter ou uma morfologia em forma de “C” (Figura 9B) (Melo and Weller 2016).

Notavelmente, EoSVs estão associadas à ativação de eosinófilos tanto in vivo quanto in vitro. Estudos demonstraram que EoSVs são encontradas ao redor e anexados a grânulos secretores no citoplasma de eosinófilos ativados (Figura 9A, B). Isso ocorre porque EoSVs podem ser formadas a partir de grânulos e transportam ativamente os produtos derivados destes (Melo, Spencer et al. 2008, Melo, Spencer et al. 2009). O número total de EoSVs aumenta quando os eosinófilos são expostos a estímulos inflamatórios. Além disso, o número de EoSVs em contato com grânulos secretores também aumenta, influenciando assim a liberação do conteúdo de EoSVs no meio extracelular (Weihrauch, Melo et al. 2024).

Esse tipo de secreção mediada por transporte vesicular é um dos mais comumente utilizados por eosinófilos envolvidos em contextos inflamatórios e

recebe o nome de desgranulação por piecemeal (Melo, Spencer et al. 2009) (Ver secção 3.8.2).

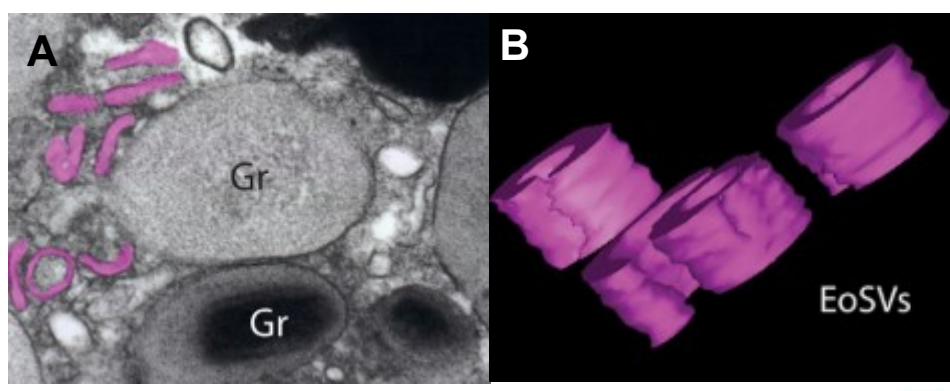


Figura 9. Morfologia Ultraestrutural e Tridimensional (3D) de EoSVs. (A) Ultraestrutura de EoSVs – [destacadas em rosa] que são observadas no citoplasma ao redor de um grânulo secretor esvaziado e aumentado. Um grânulo intacto com morfologia típica também é observado. (B) Modelos 3D obtidos a partir de análises tomográficas eletrônicas mostram EoSVs como estruturas tubulares curvas e abertas circundando um centro citoplasmático. Barra de escala: (A) 150 nm; (B) 4 μ m. Gr, grânulo secretor. Adaptado de

3.9 Contextos de Ativação de Eosinófilos

3.9.1 Ativação Celular

A MET constitui ferramenta fundamental para o entendimento da ativação celular de eosinófilos. As características ultraestruturais indicativas de ativação incluem principalmente: i) alterações dos grânulos secretores que sofrem desestruturação e diferentes graus de esvaziamento de seus conteúdos, com modificações morfológicas distintas. Estes aspectos caracterizam o que denominamos de grau de mobilização dos grânulos. Consideramos uma célula ativada quando observamos pelo menos 60% de seus grânulos mobilizados, ou seja, com perda progressiva de seus conteúdos por exocitose ou desgranulação por piecemeal (Figura 10) (Erjefalt, Greiff et al. 1999). ii) aumento na biogênese de organelas como CLs e EoSVs; iii) produção aumentada de vesículas extracelulares,

principalmente microvesículas a partir da membrana plasmática; e iii) remodelamento de mitocôndrias (Melo & Silva, 2024) (Figura 10).

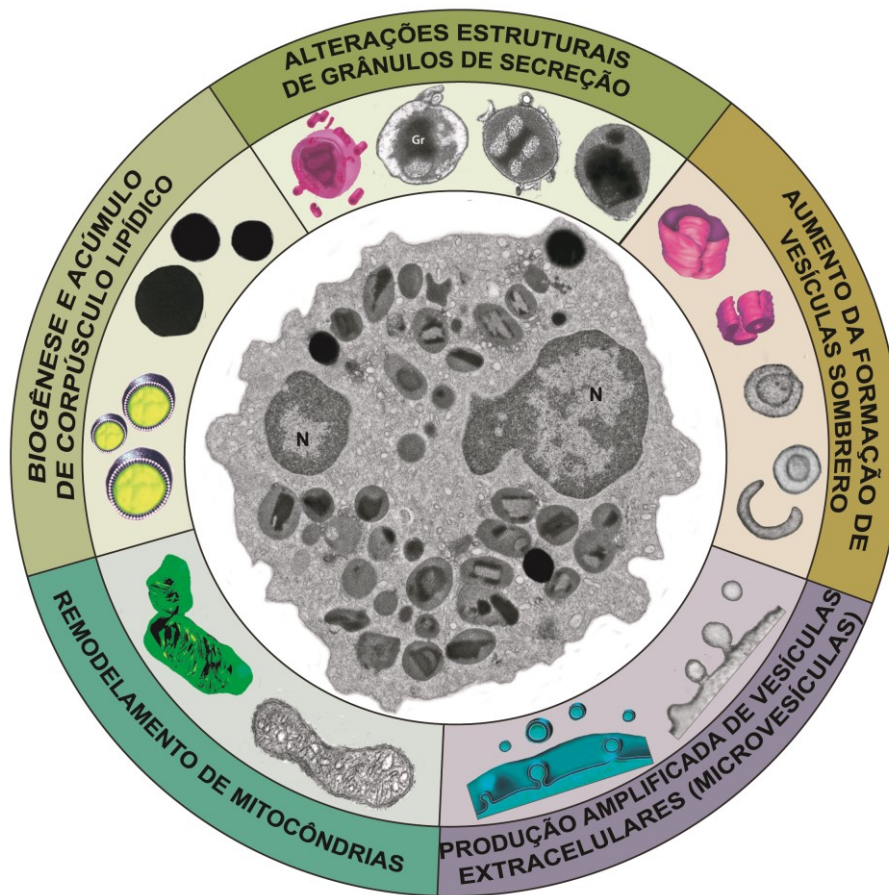


Figura 10. Alterações Ultraestruturais Observadas em Eosinófilos Ativados. Adaptado de (Melo e Silva, 2024).

3.9.2. Eosinófilos no Contexto de Doenças Intestinais

O intestino humano é o principal destino dos eosinófilos que são produzidos e amadurecidos na medula óssea e depois transferidos para os tecidos-alvo através da circulação. Na saúde, as funções mais importantes dos eosinófilos residentes no intestino compreendem a sua participação na manutenção da barreira protetora da mucosa, as interações com outras células do sistema imunológico e no fornecimento de imunidade à microbiota do lúmen intestinal (Masterson, Menard-Katcher et al. 2021).

Os eosinófilos estão intimamente envolvidos no desenvolvimento da doença inflamatória intestinal, uma vez que as proteínas granulares citotóxicas causam danos aos tecidos do hospedeiro (Woodruff, Masterson et al. 2011, Masterson, Menard-Katcher et al. 2021). No entanto, o seu papel na DC e na RCU parece seguir diferentes padrões de resposta imune. Os eosinófilos envolvidos na inflamação que leva à doença intestinal são especialmente importantes na alteração da estrutura e nas funções protetoras da barreira mucosa e na modulação do influxo maciço de neutrófilos para a lâmina própria (Woodruff, Masterson et al. 2011). O processo inflamatório parece se expandir para o muco que cobre a superfície interna do intestino. As hipóteses levantadas sugerem que as respostas imunes no muco colorretal, bem como a ETose exercida por neutrófilos e eosinófilos em ambos os lados da barreira epitelial do cólon, atuam como fatores patogénéticos adicionais na RCU e DC (Migliorisi, Mastrorocco et al. 2024). A análise da literatura também mostra uma associação entre níveis elevados de eosinófilos e melhor prognóstico do câncer colorretal (CCR) (Loktionov 2019).

3.9.3 Eosinófilos e Sinusite

Rinossinusite crônica eosinofílica (RCE) é uma condição patológica inflamatória do nariz e dos seios paranasais. Pacientes com RSE apresentam perda do olfato, congestão nasal de longo prazo, produção de muco espesso e exacerbação aguda intermitente de infecções bacterianas secundárias. A qualidade de vida desses pacientes é gravemente prejudicada. A RSE é um subtipo de sinusite crônica que se acredita ocorrer secundariamente à desregulação sistêmica dos eosinófilos (Shah, Ishinaga et al. 2016).

Várias citocinas estão envolvidas na patogênese da RSE dentre elas: IL-5, IL-13, CCL5/RANTES (Fujieda, Imoto et al. 2019). Níveis elevados de eosinófilos circulatórios e eosinófilos teciduais são características proeminentes da RSE. Uma vez que os eosinófilos entram na circulação, eles se acumulam rapidamente nos tecidos e sintetizam e liberam mediadores lipídicos, causando edema, broncoconstrição e quimiotaxia. Além disso, os eosinófilos secretam enzimas e proteínas que podem danificar os tecidos (Tsuda, Suzuki et al. 2024).

Diversos estudos demonstraram uma associação entre eosinofilia periférica e alta porcentagem de infiltração de eosinófilos nos seios paranasais (Shah, Ishinaga et al., 2016). Também foi relatada uma correlação entre a contagem de eosinófilos e a gravidade das lesões na cavidade paranasal em pacientes com RSE (Fujieda, Imoto et al., 2019). Além disso, observou-se que o aumento na contagem de eosinófilos circulantes está relacionado à gravidade da doença (Tsuda, Suzuki et al., 2024). Ainda, a porcentagem de eosinófilos circulatórios e a prevalência de complicações asmáticas são significativamente maiores em pacientes com RSCE em comparação com aqueles sem RSE, estando ambas associadas à severidade das lesões paranasais (Shah, Ishinaga et al., 2016; Tsuda, Suzuki et al., 2024).

3.9.4 Eosinófilos e Estímulos de Citocinas

O papel das citocinas no recrutamento de eosinófilos, funcionamento e ativação de eosinófilos no tecido inflamado tem sido extensivamente estudado (Figura 11) (Klion, Ackerman et al. 2020). Citocinas hematopoiéticas como IL-3, IL-5 e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) estimulam a proliferação e diferenciação de eosinófilos na medula óssea e sua posterior liberação no sangue após estímulos de ativação. Já a liberação de eosinófilos maduros da medula óssea para o sangue é promovida pela IL-5 (Weller and Spencer 2017).

Nesse processo, uma etapa importante no extravasamento de eosinófilos é a sua adesão ao endotélio vascular que são reguladas positivamente pela IL-1, IL-4, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ). Essas mesmas citocinas também podem aumentar a afinidade das moléculas de adesão tanto nos eosinófilos quanto nas células endoteliais. Além disso, diversas citocinas como IL-5, IFN- γ e TNF- α ao se associarem a outras como IL-8, RANTES, CCL11 e CCL5 atuam como fatores quimiotáticos de eosinófilos, atraindo as células para o foco inflamatório no tecido (Chopra, Shukla et al. 2024).

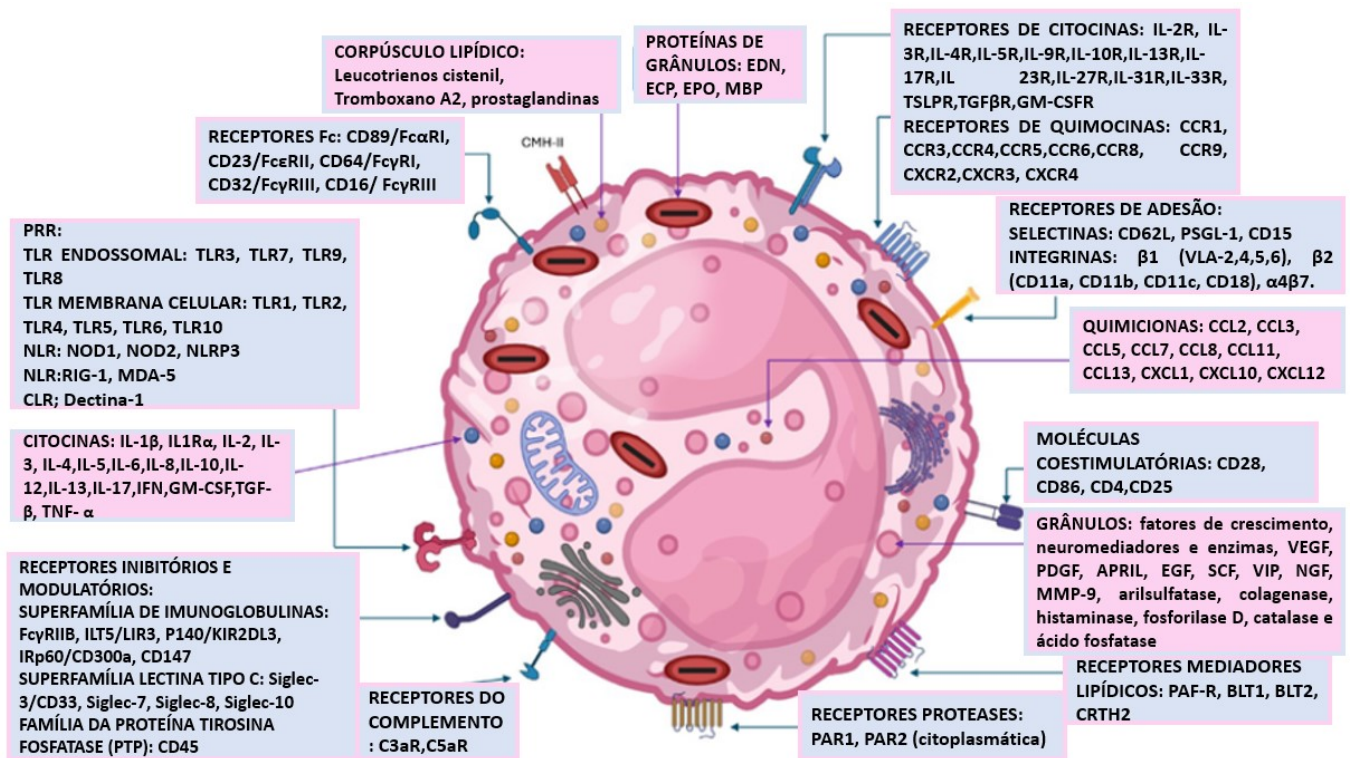


Figura 11. Representação Esquemática da Ultraestrutura do Eosinófilo. Os eosinófilos são células complexas com uma variedade de moléculas de membrana e mediadores celulares que os permitem funcionar efetivamente em seu microambiente. Eles expressam vários receptores para PAMPs/DAMPs, imunoglobulinas, citocinas, quimiocinas, proteases ou mediadores lipídicos, permitindo que eles realizem suas funções migratórias, se ativem e emitam sinais de sobrevivência, bem como interajam com outras células imunes. Essas interações envolvem integrinas de superfície e selectinas. Após a ativação, os eosinófilos liberam conteúdos de grânulos, como EDN, ECP, MBP, EPO, várias citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos. Essas proteínas são cruciais em condições inflamatórias, incluindo ambientes infecciosos e alérgicos. Sua atividade é regulada pela expressão de receptores inibitórios que limitam sua função. Adaptado de (Sahli, Vitte et al. 2025)

4 JUSTIFICATIVA

A associação entre a atividade mitocondrial e regulação da resposta imune tem despertado grande interesse por parte da comunidade científica. Embora classicamente associadas à respiração celular, geração de energia na forma de ATP e regulação da morte celular e da temperatura corporal dos indivíduos, as mitocôndrias também têm sido foco de estudos que endereçam sua participação em processos imunes (Bahat, MacVicar et al. 2021). Já é melhor compreendida sua função sinalizadora e regulatória da resposta imune em células como macrófagos e linfócitos T (Angajala, Lim et al. 2018) (Mills, Kelly et al. 2016, Vorobjeva, Chelombitko et al. 2023), mas pouco se sabe sobre o papel que elas desempenham em eosinófilos em situações de inflamação, principalmente em humanos (Erjefalt, Greiff et al. 1999, Oliveira and Lukacs 2003).

A maioria dos estudos envolvendo a população de mitocôndrias em eosinófilos envolve a regulação da apoptose e das vias metabólicas (Biswal, Panda et al. 2025). Recentemente, nosso grupo demonstrou que essas organelas estão relacionadas com a maturação de eosinófilos murinos e que sofrem alterações na forma, tamanho (área) e no número de cristas em modelos experimentais de doenças inflamatórias (Bonjour, Palazzi et al. 2022). Além disso, observamos alterações na morfologia das cristas mitocondriais em eosinófilos ativados em doenças como asma, esquistossomose e influenza A (H1N1). Mostramos que os padrões de cristas lamelares, tubulares e mistos (mistura do padrão lamelar e tubular) mudam conforme o tipo de doença (Bonjour, Palazzi et al. 2022). Essas alterações nos padrões de cristas são reconhecidas na literatura como indicativos de adaptação mitocondrial ao microambiente no qual a célula está inserida (Bonjour, Palazzi et al. 2022, Kawano, Bazila et al. 2023).

Uma pergunta levantada pelo grupo é se essas alterações também ocorrem em mitocôndrias de eosinófilos humanos participando de respostas inflamatórias. Para responder, buscamos, neste trabalho, investigar a população mitocondrial tanto em eosinófilos isolados do sangue periférico humano e estimulados com citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , CCL11, CCL5 e IL-5), como em eosinófilos infiltrados no microambiente tecidual durante doenças eosinofílicas (biópsias de pacientes acometidos por DC, RCU e RCE).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta e Isolamento de Eosinófilos do Sangue Periférico

Amostras de sangue periférico de 3 doadores humanos adultos saudáveis foram coletadas e os eosinófilos maduros foram isolados conforme trabalhos anteriores (Neves, Perez et al. 2009). As coletas foram realizadas no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ), Rio de Janeiro, RJ. Todos os protocolos e procedimentos experimentais que envolveram eosinófilos isolados de sangue humano foram aprovados pelo Comitê de Pesquisa em Seres Humanos com o consentimento informado que foi obtido de acordo com os protocolos aprovados pelo Conselho de Ética em Pesquisa — Hospital Clementino Fraga Filho (licença número 190/09).

Brevemente, os eosinófilos maduros foram isolados pelo método de seleção negativa para o enriquecimento e purificação das amostras, utilizando coquetel de enriquecimento (StemSep; StemCell Technologies, Seattle, WA, EUA) em meio RPMI 1640 a 37°C por 1h. Foi feito ainda o procedimento de *MACS bead* para purificação de células sanguíneas. Nesse processo utiliza-se um método de classificação imunomagnética de células (MACS) para separação das células eosinofílicas com utilização de pequenas esferas magnéticas (Melo, Spencer et al. 2009).

5.2 Estímulo por Citocinas

Eosinófilos isolados do sangue de 3 doadores saudáveis (3×10^5 células/mL) foram estimulados ou não com fator de necrose tumoral alfa (TNF- α ; 200 ng/mL, catálogo #300-02-500UG, Fisher Scientific, Medford, MA, EUA), CCL11 (100 ng/mL, catálogo #14-7085-82, Fisher Scientific) e CCL5 (100ng/mL, catálogo #EPX01B-12120-901, Fisher Scientific) em meio RPMI-1640 a 37°C, por 1 h, conforme trabalhos anteriores (Salcedo, Young et al. 2001, Kato, Fukunaga et al. 2011, Carmo, Bonjour et al. 2018).

5.3 MitoSox e MitoTracker

MitoSOX green e MitoTracker red superoxidados foram obtidos de Invitrogen/Thermo Fischer Scientific (catálogo #M36009 green para o MitoSOX e #M7512 red para o MitoTracker - Waltham, MA, EUA). A partir disso, o fluoróforo liofilizado foi preparado com dimetilsulfóxido (DMSO) para a solução de trabalho em uma concentração final de 1.10^4 nM. Foram utilizados 2 μ L de solução de trabalho acrescidos de 198 μ L de tampão fosfato (PBS) em pH 7,4 para a preparação das células. As células foram encubadas por 40 minutos a TA (Kalinovic, Oelze et al. 2019) para análise posterior por citometria de fluxo.

5.4 Citometria de Fluxo

Para a análise de citometria de fluxo, os eosinófilos (3×10^5 células/poço) foram lavados com PBS 0,1%. Os dados foram obtidos pelo citômetro de fluxo (1000 eventos) FACS Calibur (BD Biosciences) e analisados usando o software Floreada.io (<https://floreada.io/> - acesso em 02/12/2024). Células positivas foram identificadas e comparadas ao controle eosinofílico apropriado (Sebag, Koval et al. 2017).

5.5 Obtenção de Biópsias de Pacientes Acometidos por Doença de Crohn, Colite Ulcerativa e Sinusite

Biópsias do íleo e/ou do reto foram obtidas durante o processo de proctocolectomia de pacientes que sofriam de RCU (n = 15 pacientes). Também foram coletadas biópsias do íleo a partir de ileocectomia de pacientes acometidos por DC (n= 13 pacientes). Foram coletados ainda, tecido dos seios intranasais de pacientes diagnosticados com RCE (n = 2 pacientes).

Essas doenças são consideradas tipicamente como patologias eosinofílicas (Carvalho, Elia et al. 2003, Lampinen, Backman et al. 2008, Kennedy and Borish 2013). Após coleta, todas as amostras foram imediatamente fixadas e preparadas para MET como descrito no item 5.6. Todas as biópsias usadas neste trabalho

foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Ann Dvorak (Harvard Medical School, Boston, MA, EUA), com aprovação prévia do comitê de ética do Hospital Beth Israel Deaconess Medical Center (CCI/BIDMC).

5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Eosinófilos isolados do sangue de pacientes saudáveis e biópsias do intestino foram imediatamente fixadas em Karnovsky modificado (paraformaldeído 1% e glutaraldeído 1,25 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4) por 1 h em TA, lavadas no mesmo tampão e centrifugadas a 400 rpm por 10 min. As amostras foram então ressuspensas em ágar 2% em tampão de cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,4) e rapidamente centrifugadas (MELO, 2009). Os pellets resultantes foram mantidos no mesmo tampão a 4°C para processamento adicional. Os pellets de eosinófilos foram então pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% em tampão de Sym-Collidine (pH 7,4) por 2 h em TA. Após lavar com tampão de maleato de sódio (pH 5,2) os pellets foram contrastados com acetato de uranila 2% em tampão de maleato de sódio 0,05 M (pH 6,0) por 2h *en bloc* e lavados com o mesmo tampão antes da desidratação gradual em etanol. A infiltração e inclusão foram feitas em resina Epon (Ted Pella, Redding, CA, EUA). Após polimerização a 60°C por 16 h, secções ultrafinas das amostras foram feitas usando uma lâmina de diamante em um ultramicrotomo (Leica, Bannockburn, IL, EUA). As secções foram montadas em grades de cobre (200-mesh; Ted Pella) e contrastadas com citrato de chumbo e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (P300; Philips, Eindhoven, Países Baixos) conforme trabalhos anteriores (Melo, Spencer et al. 2009).

5.7 Análises Ultraestruturais

Para os estudos da ultraestrutura geral de mitocôndrias de eosinófilos por MET, eletromicrografias foram aleatoriamente obtidas em aumentos de 2.600X a 13.000X. Foram analisadas um total de 166 secções celulares com quantificação realizada nas micrografias eletrônicas que mostravam secções transversais que apresentavam todo o perfil celular e o núcleo celular. Eosinófilos maduros foram identificados com base nas suas características ultraestruturais, que apresentaram:

(i) núcleo lobulado; e (ii) presença de grânulos com cristaloide em diferentes proporções, conforme trabalhos anteriores (Bonjour, Palazzi et al. 2022). As mitocôndrias de eosinófilos maduros, submetidos a estímulo por citocinas e envolvidos em doenças intestinais foram avaliadas ultraestruturalmente de forma individual e por secção celular. No total foram avaliadas 166 células e 1018 mitocôndrias (Tabela 1). Todas as análises morfométricas e quantitativas foram realizadas com auxílio do programa Fiji 1.53c (ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

Grupo	Número de células	Número de mitocôndrias
Controle	13	82
TNF- α	31	221
CCL-5	22	101
CCL-11	18	103
Doença de Crohn	28	176
Retocolite Ulcerativa	25	145
Sinusite	29	190
Soma	166	1018

Tabela 1: Quantificação de Eosinófilos e Mitocôndrias para as Análises Ultraestruturais.

5.7.1 Análises Ultraestruturais Quantitativas

Foi realizada uma análise morfométrica detalhada dos seguintes aspectos ultraestruturais: 1) Mobilização de grânulos caracterizada pelo tamanho do grânulo, esvaziamento ou fusão de grânulos com outro grânulo ou membrana plasmática; 2) Área de grânulos 3) Números de EoSVs; 4) Números de CLs; 5) Área de CLs; 6) Área de mitocôndrias/secção celular 7) Número de mitocôndrias/secção celular 8) Tamanho mitocondrial (área de mitocôndrias individuais); 9) Volume de cristas; 10) Proporção dos padrões de cristas (%); 11) Interações entre mitocôndrias e outras organelas no citoplasma (todas as interações inter-organelares envolvendo mitocôndrias foram representadas por locais de contato com a membrana mitocondrial); 12) Número de sítios de contato identificados entre mitocôndrias e outras organelas 13) Distribuição da proporção de interações inter-organelares em cada grupo analisado. Todos os parâmetros analisados foram realizados conforme trabalhos anteriores (Picard and McEwen 2014, Bonjour, Palazzi et al. 2022, Melo and Rothenberg 2024).

5.8 Análises Estatísticas

Foi realizada a análise de normalidade, teste Shapiro-Wilk, para todas as variáveis descritas acima, considerando o valor $P < 0.05$ estatisticamente significativo. Em seguida, foram realizados testes estatísticos de Análise de Variância (ANOVA) uni ou bidirecional, seguida de teste de Tukey de múltiplas comparações ou teste T de Student, feito pelo software GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo em todas as ocasiões.

6 RESULTADOS

6.1 Eosinófilos Humanos são Ativados Quando Estimulados com Citocinas Inflamatórias

Para entender como os eosinófilos respondem à estímulos de citocinas pró-inflamatórias in vitro (TNF- α , CCL5 e CCL11), realizamos um estudo qualitativo e quantitativo detalhado usando MET para identificar sinais ultraestruturais de ativação de eosinófilos, conforme trabalhos anteriores (Melo and Silva 2024). Inicialmente, eosinófilos foram isolados de amostras de sangue periférico de doadores saudáveis (N=3) e analisados por MET (n = 84) (Figura 12A).

Nossas análises mostraram eosinófilos maduros com diferentes níveis de mobilização de seus grânulos secretores (específicos), caracterizados por sinais de liberação dos seus conteúdos para o meio (Figura 12B-E). Ao compararmos, qualitativamente a forma como os eosinófilos de cada grupo secretavam seus produtos, observamos que os grânulos no grupo estimulado apresentaram as seguintes formas de liberação de seus conteúdos: exocitose clássica, exocitose composta, desgranulação por piecemeal (PMD), citólise (Figura 12F-H). Em seguida, quantificamos a área média de grânulos em cada grupo. Foi observado uma redução significativa no tamanho dos grânulos nos grupos TNF- α e CCL5 em comparação ao controle (Controle = $0,25 \pm 0,06$; TNF- α = $0,36 \pm 0,08$; CCL5 = $0,24 \pm 0,05$; CCL11 = $0,26 \pm 0,06$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$, Figura 12I). Analisamos ainda, a proporção dos sinais de mobilização dos grânulos de eosinófilos observados em cada grupo. A partir dessas análises, vimos que a maioria dos grânulos de células estimuladas com TNF- α está em processo de fusão com outros grânulos (classicamente ligados à exocitose clássica), enquanto que grânulos de células estimuladas com CCL5 e CCL11 apresentam esvaziamento de grânulos, mecanismo classicamente ligado à PMD, enquanto o grupo controle apresentou apenas grânulos intactos e esvaziando, sem evidências de fusão de grânulos (Intacto: controle = $57,5\% \pm 3,8$; TNF- α = $1,2\% \pm 0,7$; CCL5 = $7,6 \pm 0,9$; CCL11 = $3,8 \pm 1$. Esvaziando: controle = $42,5\% \pm 1,8$; TNF- α = $40,9\% \pm 1,8$; CCL5 = $85,7\% \pm 2,2$; CCL11 = $90,1\% \pm 3,4$. Mobilizado: controle = 0 ± 0 ; TNF- α = $57,9\% \pm 3,7$; CCL5 = $6,7\% \pm 1,5$; CCL11 = $6,1\% \pm 2,2$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 12J).

Além dos grânulos, avaliamos ainda, o número de CLs (controle = $1,9 \pm 0,2$; TNF- α = $3,7 \pm 0,9$; CCL5 = $2 \pm 0,2$; CCL11 = $3 \pm 0,1$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 12K), a área de CLs (controle = $0,2 \pm 0,02$; TNF- α = $0,28 \pm 0,001$; CCL5 = $0,31 \pm 0,04$; CCL11 = $0,24 \pm 0,02$; média- $\mu\text{m}^2 \pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 12L) e o número de EoSVs (controle = $4,7 \pm 2$; TNF- α = $11,3 \pm 3,2$; CCL5 = $10,4 \pm 1$; CCL11 = $32 \pm 4,8$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 12N) dos grupos mencionados anteriormente, uma vez que essas duas organelas constituem bons marcadores inflamatórios (Melo, 2011). Foi observado um aumento significativo do número médio de CLs em TNF- α e CCL11 em comparação ao grupo controle (Figura 12K), enquanto a área de CL se mostrou maior todos os grupos estimulados (Figura 12L, M). Quanto ao número de EoSVs, a exemplo do que foi visto para a área de CLs, também ocorreu aumento significativo em seu número em todos os grupos de estímulos quando comparados com o grupo controle (Figura 12N).

Em conjunto, as análises ultraestruturais demonstraram que ocorreu ativação celular em células estimuladas por citocinas, uma vez que sinais clássicos do processo de ativação foram observados.

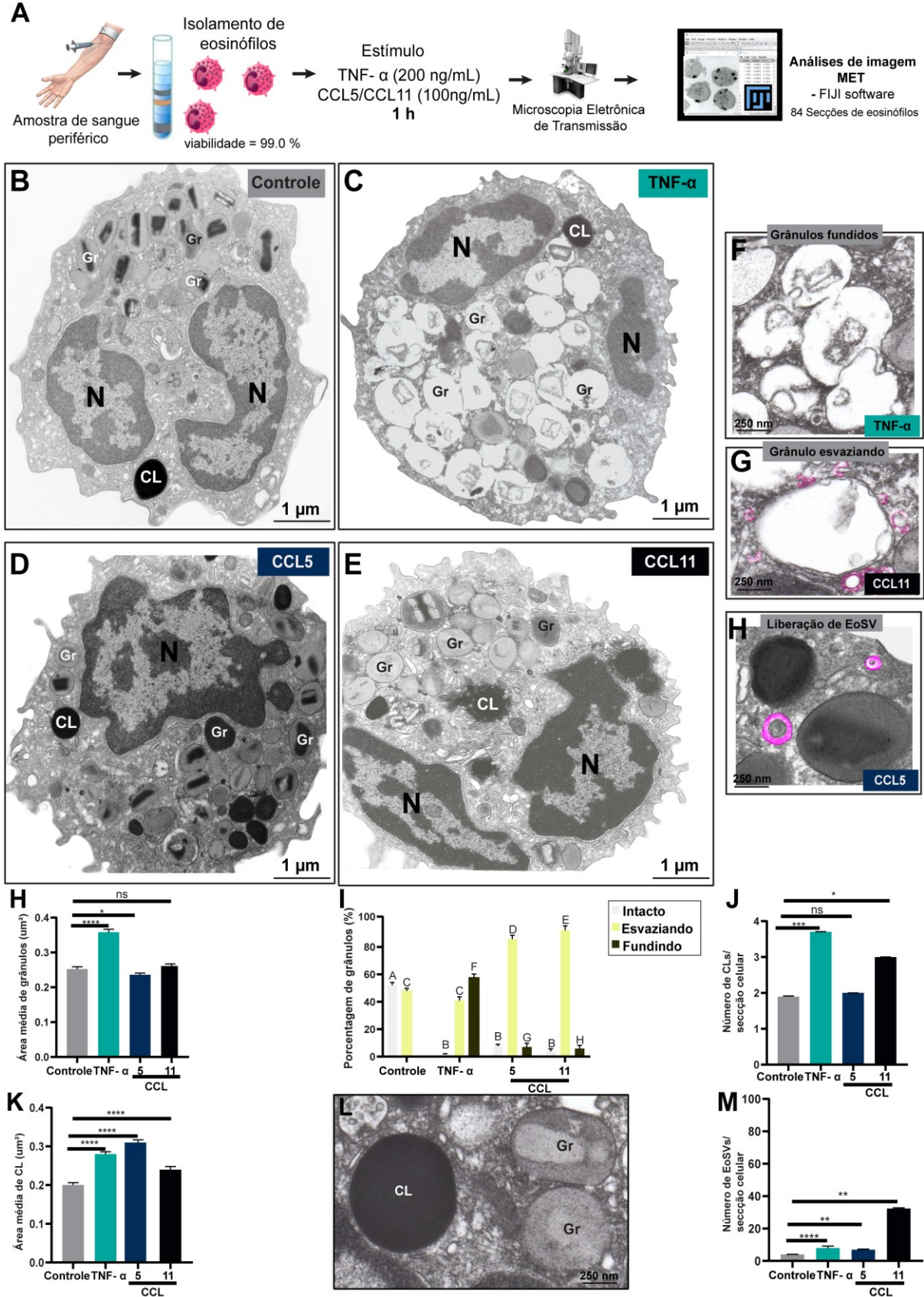


Figura 12. Caracterização do Processo de Ativação de Eosinófilos. (A) Desenho experimental para avaliar a ativação de eosinófilos isolados do sangue periférico de doadores humanos adultos

saudáveis através do estímulo com TNF- α , CCL5 e CCL11 por 1 hora. Eosinófilos foram processados para MET e avaliados com o software *Fiji*. (B-E) Micrografias eletrônicas representativas de eosinófilos maduros e ativados. (B) Controle; (C) Estimulado por TNF- α ; (D) Estimulado por CCL5; (E) Estimulado por CCL11. (F-H) Destaques mostrando diferentes estágios de ativação de grânulos específicos. (F) Formação de grandes canais formados por fusões grânulo-grânulo que caracterizam a exocitose composta após a estimulação por TNF- α . (G) Grânulo específico em processo de esvaziamento, após a estimulação com CCL5, apresentando matriz elétron-lúcida com a liberação de diversas EoSVs, destacadas em rosa. (H) Liberação de EoSVs durante a estimulação por CCL11. (I) Área média de grânulos (μm^2) que aumenta significativamente após a estimulação por TNF- α e CCL5. As letras A-H indicam diferenças estatísticas. Letras iguais apontam para não significância. (J) Porcentagem (%) de grânulos em cada estágio de mobilização. Intacto: que apresentam cristaloide central e matriz bem definidos; Esvaziando: grânulos específicos em processo de mobilização através da liberação de conteúdo; Fundindo: grânulos específicos em processo de fusão. (K) O número de CLs por secção celular aumenta significativamente após a estimulação por TNF- α e CCL5. (L) A área média de CL aumenta após a estimulação por TNF- α , CCL5 e CCL11. (M) Destaque do citoplasma de um eosinófilo mostrando CL elétron-denso e grânulos específicos. (N) O número de EoSVs por secção celular aumenta após a estimulação por TNF- α , CCL5 e CCL11. N, núcleo; Gr, grânulo específico de eosinófilos; CL, corpúsculo lipídico. Resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão (ns = não significativo; * $P < 0,001$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$; **** $P < 0,00001$).

6.2 Mitocôndrias Sofrem Alterações Funcionais e Ultraestruturais em Eosinófilos Estimulados In Vitro

Durante a ativação celular, as mitocôndrias parecem orquestrar a resposta imune passando por mudanças morfológicas e metabólicas que impulsionam o desenvolvimento e a função das células imunes (Breda, Davanzo et al. 2019). Para avaliar possíveis mudanças em sua atividade, mitocôndrias de eosinófilos isolados do sangue periférico, estimulados ou não com diferentes estímulos inflamatórios (TNF- α , CCL5 e CCL11), foram avaliadas por citometria de fluxo através do ensaio com MitoTracker e MitoSox (Figura 13A). Esses marcadores são comumente usados para rastrear a permeabilidade da membrana mitocondrial (Figura 13B, C) e níveis de estresse oxidativo mitocondrial (produção de ROS, Figura 13D, E), respectivamente. Observamos que as células estimuladas apresentaram uma porcentagem maior de células MitoSox high e MitoTracker high em comparação com o grupo controle (MitoTracker: controle = $16,8\% \pm 1,2$; TNF- α = $33,8\% \pm 7,2$; CCL5 = $61\% \pm 7,4$; CCL11 = $28,2\% \pm 5,6$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$;

Figura 13B, C; MitoSox: controle = $14,6\% \pm 2,4$; TNF- α = $30,1\% \pm 7$; CCL5 = $46\% \pm 5,8$; CCL11 = $24,5\% \pm 8,1$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 13D, E). Esses resultados indicam, portanto, que os eosinófilos são influenciados por condições inflamatórias in vitro, exibindo sinais de atividade e resposta mitocondrial aumentada, o que pode potencialmente impactar a função celular.

As descobertas de aumento da atividade mitocondrial em eosinófilos estimulados in vitro levaram à investigação de possíveis alterações ultraestruturais mitocondriais associadas com esse aumento. Amostras de eosinófilos estimulados in vitro com TNF- α , CCL5 e CCL11, foram processadas para MET para avaliação qualitativa e quantitativa. Micrografias eletrônicas de 84 eosinófilos foram analisadas e 507 mitocôndrias foram quantificadas (Figura 13A).

Inicialmente, a distribuição das mitocôndrias foi investigada em eosinófilos estimulados. Para essa análise, a área total de mitocôndrias de cada célula foi quantificada e esse valor dividido pela área de citoplasma da célula, excluindo a área nuclear [soma das áreas de mitocôndrias/(área da célula – área do núcleo)], conforme padronizado em estudo anterior do grupo (Bonjour, Palazzi, 2022). Observamos uma redução significativa da área total de mitocôndrias após estimulação com TNF- α e CCL11, mas não com CCL5 (controle = $1,3 \pm 0,1$; TNF- α = $2,1 \pm 0,2$; CCL5 = $1,4 \pm 0,1$; CCL11 = $1,1 \pm 0,6$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 13F). Em seguida, o número de mitocôndrias por secção celular foi determinado e encontramos aumento significativo em todos os grupos estimulados em comparação ao grupo controle (controle = $2,1 \pm 0,25$; TNF- α = $2,4 \pm 0,18$; CCL5 = $1,4 \pm 0,1$; CCL11 = $1,1 \pm 0,13$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 13G).

Por último, considerando que mitocôndrias podem apresentar diferentes tamanhos (Pernas, 2016), as áreas individuais dessas organelas foram avaliadas em cada célula. Nossas análises revelaram um aumento significativo das áreas de TNF- α e uma redução significativa em CCL5 e CCL11 comparados com o grupo controle (controle = $0,06 \pm 0,004$; TNF- α = $0,14 \pm 0,02$; CCL5 = $0,065 \pm 0,002$; CCL11 = $0,07 \pm 0,003$; média- $\mu\text{m}^2 \pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 13H).

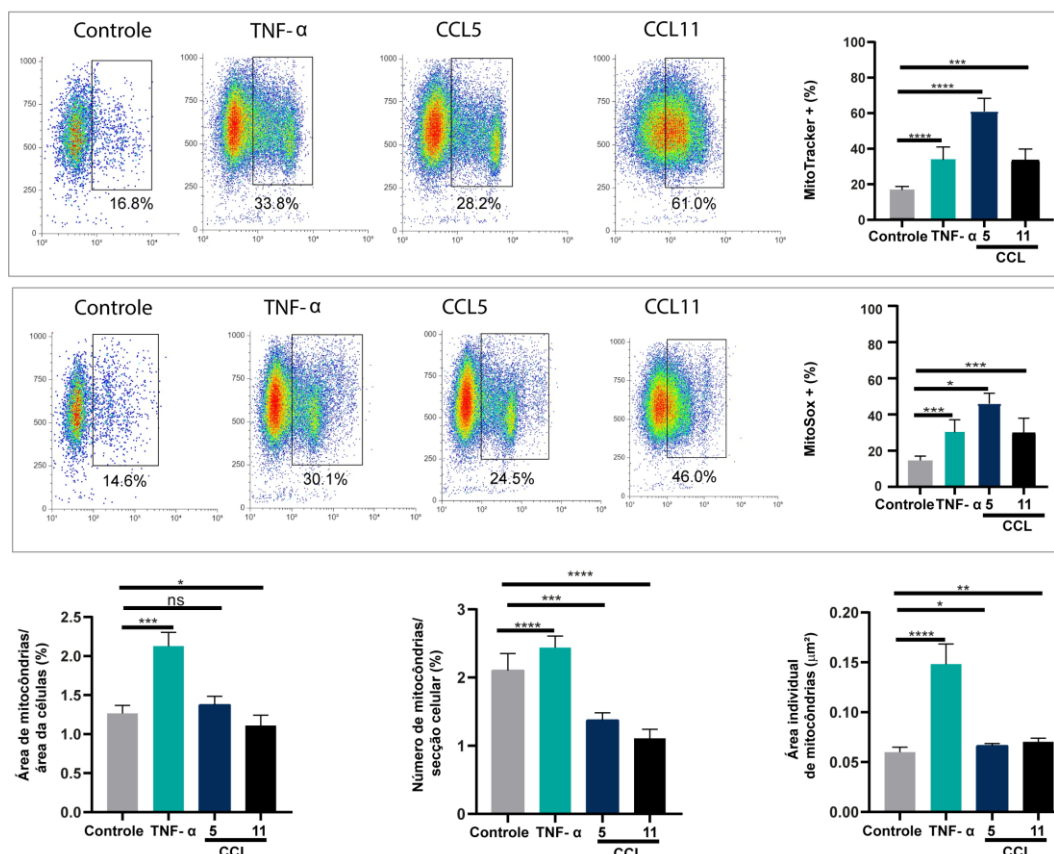


Figura 13. Mitocôndrias Sofrem Alterações Morfológicas e Funcionais em Eosinófilos Estimulados In Vitro. (A) Desenho experimental para avaliar a resposta mitocondrial de eosinófilos isolados do sangue periférico de pacientes humanos saudáveis após a estimulação in vitro por TNF- α , CCL5 e CCL11 por 1 hora. Eosinófilos foram processados para MET e avaliados no software *Fiji* (n = 84). Citometria de fluxo também foi realizada para avaliação mitocondrial através do ensaio de MitoTracker (permeabilidade mitocondrial) e MitoSox (liberação de ROS). (B) Citometria de fluxo para marcação de células MitoTracker high para avaliação de permeabilização de membrana. (C) A permeabilidade da membrana de mitocôndrias aumenta significativamente após o estímulo por TNF- α , CCL5 e CCL11. (D) Citometria de fluxo para marcação de células MitoSox high para avaliação da produção de ROS. (E) A liberação de ROS aumenta nas mitocôndrias de eosinófilos após o estímulo por TNF- α , CCL5 e CCL11. (F) A área de mitocôndrias por área de células aumenta após a estimulação por TNF- α e CCL11. (G) O número de mitocôndrias por secção celular aumenta após o estímulo por TNF- α , CCL5 e CCL11. (H) A área individual de mitocôndrias (μm^2) aumenta após a estimulação por TNF- α , CCL5 e CCL11. Resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. (ns = não significativo; * $P < 0,001$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$; **** $P < 0,00001$).

As descobertas de aumento da atividade de mitocôndrias em paralelo com alterações de seus parâmetros morfológicos em eosinófilos estimulados in vitro nos perguntaram se alterações ultraestruturais mitocondriais também ocorrem em eosinófilos in vivo. Para responder essa pergunta, investigamos doenças

eosinofílicas, particularmente doenças inflamatórias intestinais e respiratórias. Assim, amostras de biópsia do intestino de pacientes com RCU e DC e do sino de pacientes acometidos com RCE foram obtidas e processadas para MET para análises qualitativa e quantitativa. Micrografias eletrônicas de 82 eosinófilos foram analisadas e 511 mitocôndrias foram quantificadas (Figura 14).

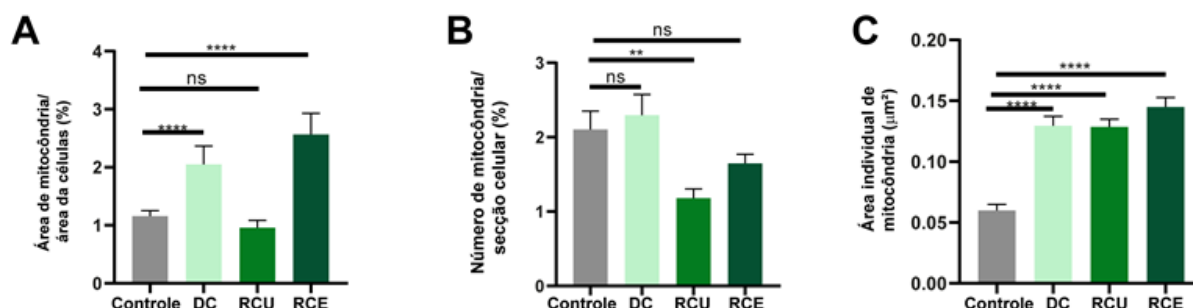


Figura 14. Análise Ultraestrutural de Mitocôndrias em Doenças Eosinofílicas (Doença de Chron – DC, Retocolite Ulcerativa – RCU e Sinusite Eosinofílica – RCE). (A) A área de mitocôndrias por área de células aumenta em contextos de DC e RCE. (B) O número de mitocôndrias por secção celular aumenta em contextos de DC e RCE. (C) A área individual de mitocôndrias (μm^2) aumenta em contextos de DC, RCU e RCE. Resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. (ns = não significativo; $**P < 0,005$; $****P < 0,0001$).

Imagens analisadas de eosinófilos revelaram que as mitocôndrias sofrem aumento da área total em DC e RCE (controle = $1,16 \pm 0,09$; DC = $2,04 \pm 0,31$; RCU = $0,95 \pm 0,12$; RCE = $2,56 \pm 0,36$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 14A). Já em relação ao número mitocondrial, apenas a RCU apresentou diferença significativa em relação ao controle (controle = $2,1 \pm 0,25$; DC = $2,3 \pm 0,28$; RCU = $1,18 \pm 0,12$; RCE = $1,65 \pm 0,12$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 14B). Avaliamos também a área individual de mitocôndrias e observamos que ocorre aumento da área em todos os grupos quando comparados ao controle (controle = $0,06 \pm 0,004$; DC = $0,12 \pm 0,008$; RCU = $0,13 \pm 0,006$; RCE = $0,14 \pm 0,007$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 14C). Esse conjunto de dados corrobora que a atividade e a ultraestrutura mitocondrial são influenciadas pelo microambiente ao qual o eosinófilo está inserido.

6.3 Mitocôndrias de Eosinófilos Sofrem Alteração de Padrão de Crista

Aspectos de alteração na atividade mitocondrial são bem descritas na literatura como resultado do remodelamento das cristas (Buck, 2016). Primeiro, nos perguntamos se ocorre algum tipo de alteração nas cristas mitocondriais de eosinófilos estimulados *in vitro* por citocinas (TNF- α , CCL5, CCL11). Nossas análises quantitativas mostraram que o volume das cristas aumentou em eosinófilos estimulados (controle = $0,21 \pm 0,02$; TNF- α = $0,46 \pm 0,09$; CCL5 = $0,48 \pm 0,02$; CCL11 = $0,28 \pm 0,03$; média $\pm$ SEM; $P < 0,05$; Figura 15A) em comparação ao grupo controle.

Em seguida, investigamos a morfologia das cristas em alta resolução por MET. Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa descreveu três padrões de cristas encontrados em mitocôndrias: lamelar, tubular e misto (Bonjour, Palazzi et al. 2022). Imagens ultraestruturais da população de mitocôndrias de eosinófilos mostraram que as cristas lamelares, quando vistas em cortes ultrafinos, se apresentam em microscopia eletrônica como estruturas mais elétrôn-densas com essas cristas dispostas na matriz mitocondrial de forma paralela umas com as outras, enquanto as cristas tubulares são detectadas como estruturas circulares, correspondendo às secções transversais dos túbulos. Já as cristas mistas mostram os dois tipos estruturais na mesma mitocôndria (Figura 15B, Bi, Bii). Portanto, com base no aumento do volume das cristas encontrado em eosinófilos estimulados *in vitro*, investigamos a proporção na mesma mitocôndria (Figura 15C). Surpreendentemente, observamos que as mitocôndrias do grupo controle exibiram apenas padrões lamelares ou tubulares (83% e 17%, respectivamente), enquanto as mitocôndrias de eosinófilos estimulados *in vitro* apresentaram todos os três padrões de cristas, com variações dependendo do estímulo (TNF- α = 20% lamelar, 16% tubular e 64% misto; CCL5 = 40% lamelar, 10% tubular e 50% misto, CCL11 = 70% lamelar, 10% tubular e 20% misto).

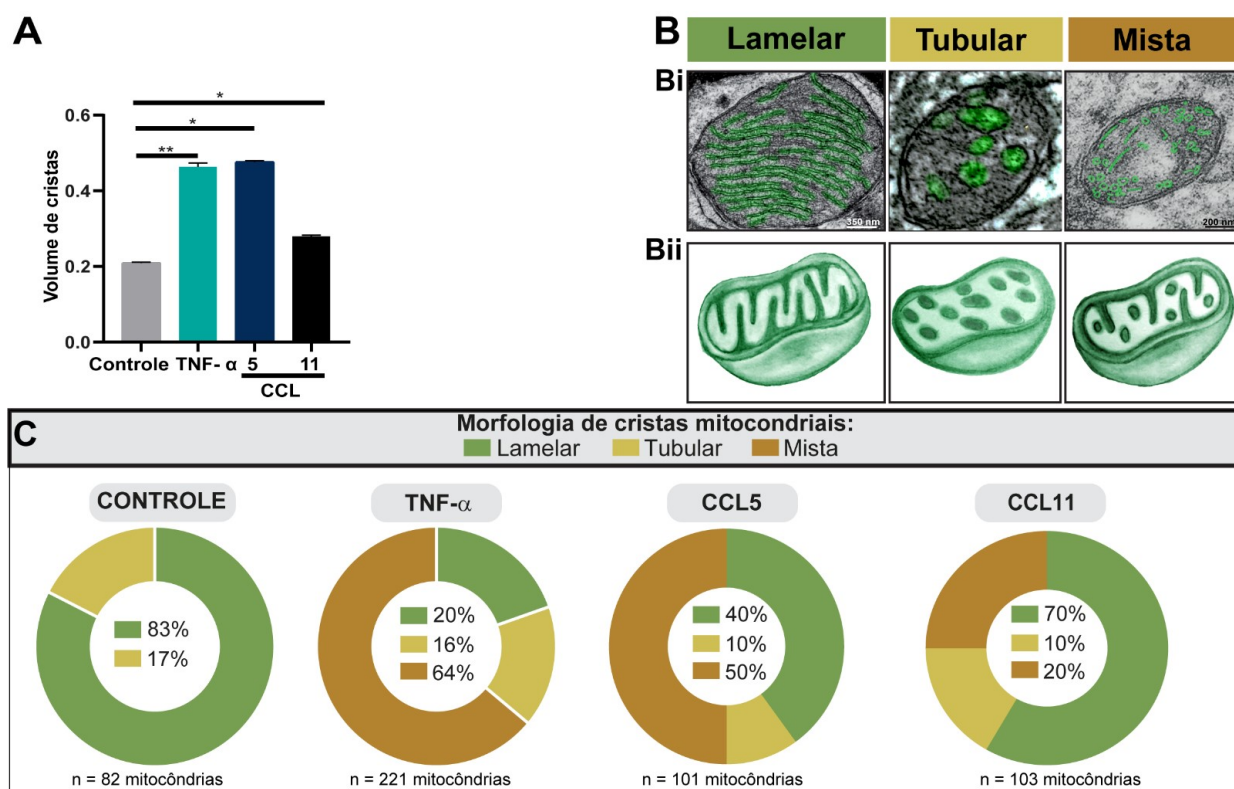


Figura 15. Aspectos Ultraestruturais das Cristas Mitocondriais de Eosinófilos Estimulados In Vitro. (A) O volume de crista mitocondrial aumenta em todos em células estimuladas por TNF- α , CCL5 e CCL11. (B) Ultraestrutura e desenho esquemático das diferentes morfologias de cristas mitocondriais (lamelar, tubular e mista). (Bi) Ultraestrutura representativa de mitocôndrias apresentando os três tipos de cristas (destacados em verde). (Bii) Ilustração ultraestrutural dos três tipos de cristas. (C) O remodelamento de crista é observado em todos os contextos de estimulação de eosinófilos quando comparados com o grupo controle. As amostras foram preparadas para MET e avaliadas no software *Fiji*. O total de 507 mitocôndrias foram avaliados em alta resolução em 84 eosinófilos provenientes de pelo menos 3 pacientes saudáveis em 3 experimentos independentes. Resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. (* $P < 0,02$; ** $P < 0,001$).

Em seguida, investigamos as cristas mitocondriais em eosinófilos envolvidos em doenças inflamatórias (DC, RCU e RCE). Inicialmente, nos perguntamos que tipos de alterações as cristas mitocondriais podem sofrer nos contextos mencionados anteriormente. O volume das cristas aumentou nos grupos de doenças inflamatórias em comparação ao grupo controle (controle = $0,21 \pm 0,02$; DC = $0,46 \pm 0,09$; RCU = $3,8 \pm 0,29$; RCE = $2 \pm 0,24$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 16A).

Em seguida, investigamos a morfologia das cristas por MET aplicando a mesma metodologia usada para as análises in vitro. Considerando que ocorreu

aumento significativo do volume das cristas, investigamos a proporção de cada formato de crista nessas mitocôndrias (Figura 16B). Interessantemente, as mitocôndrias de eosinófilos teciduais participando em DC, RCU e RCE apresentaram todos os padrões de cristas acima mencionados, com variações dependendo do tipo de doença (DC = 42% lamelar, 28% tubular e 30% misto; RCU = 39% lamelar, 34% tubular e 27% misto; RCE = 56% lamelar, 12% tubular e 32% misto). Os resultados demonstram que as mitocôndrias de eosinófilos sofrem remodelação de suas cristas durante resposta a estimulação inflamatória in situ causada por doenças eosinofílicas, implicando a participação potencial dessas organelas durante a resposta imune.

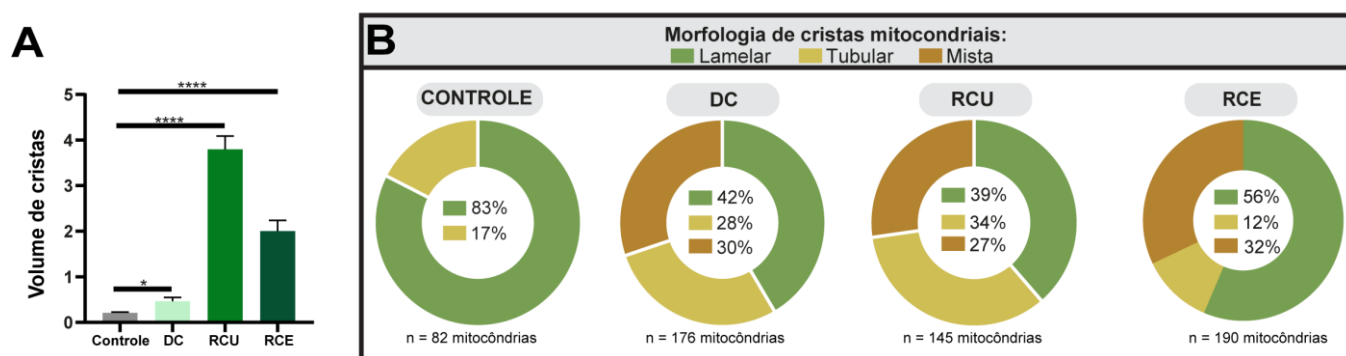


Figura 16. Aspectos Morfológicos das Cristas Mitochondriais de Eosinófilos em Doenças Eosinofílicas. (A) O volume das cristas mitocondriais de eosinófilos aumenta no contexto de DC, RCU e RCE. (B) O remodelamento de crista é observado em todos os contextos de doenças eosinofílicas quando comparados com o grupo controle. As amostras foram preparadas para MET e avaliadas no software *Fiji*. O total de 593 mitocôndrias foram avaliados em alta resolução em 95 eosinófilos advindos de pelo menos 3 pacientes saudáveis em 3 experimentos independentes. Resultados são expressos em média ± erro padrão. (* $P < 0,02$; **** $P < 0,0001$).

6.4 A Ativação de Eosinófilos Induz Interação de Mitocôndrias com Outras Organelas Celulares

Está bem estabelecido que durante a ativação celular de células dendríticas, as mitocôndrias alteram alguns aspectos de sua dinâmica e interagem com diferentes organelas celulares de acordo com o microambiente tecidual (Marin, Marin et al. 2021).

Em estudo anterior do nosso grupo, interações inter-organelares (mitocôndria-mitocôndria, mitocôndria-CL e mitocôndria-grânulo) foram observadas

em eosinófilos estimulados in vitro (Bonjour, Palazzi. et al, 2022). Essas interações foram identificadas por MET como locais de contato de membrana entre organelas (pequenas áreas com espessura aumentada e aumento de elétrondensidade ao longo das interfaces das membranas das organelas), além de pontes de membrana - “*thetters*” (estreitas “projeções” formadas a partir da membrana da organela) (Csordás, Renken et al. 2006).

No presente trabalho, avaliamos a ocorrência e quantificamos a proporção de todas as interações de mitocôndrias com cada organela no citoplasma dos eosinófilos após a estimulação in vitro (Figura 15). As seguintes interações inter-organelares foram observadas com aumento significativo: mitocôndria-retículo endoplasmático (RE) (controle = $28\% \pm 3$; TNF- α = $80\% \pm 9$; CCL5 = $42,1\% \pm 3$; CCL11 = $73\% \pm 4$; média $\pm$ SEM; $P < 0,05$; Figura 17A;), mitocôndria-CL (controle = 0 ± 0 ; TNF- α = $13\% \pm 3$; CCL5 = $17,1\% \pm 3$; CCL11 = $38,4\% \pm 4$; média $\pm$ SEM; Figura 17B) mitocôndria-mitocôndria (controle = $14\% \pm 6$; TNF- α = $21\% \pm 0,2$; CCL5 = $26,9\% \pm 4$; CCL11 = $36,8\% \pm 5$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 17C), mitocôndria-grânulos secretores (controle = $19\% \pm 2$; TNF- α = $99,9\% \pm 1$; CCL5 = $28,9\% \pm 1$; CCL11 = $55,5\% \pm 6$; média $\pm$ SEM; $P < 0,05$; Figura 17D) e mitocôndria-EoSVs (controle = $4\% \pm 9$; TNF- α = $16\% \pm 4$; CCL5 = $37,9\% \pm 3$; CCL11 = $53,5\% \pm 4$; média $\pm$ SEM; $P < 0,05$; Figura 17E).

A partir dessas análises, concluímos que as mitocôndrias respondem à estímulos inflamatórios com o estabelecimento de sítios de contato com outras organelas citoplasmáticas.

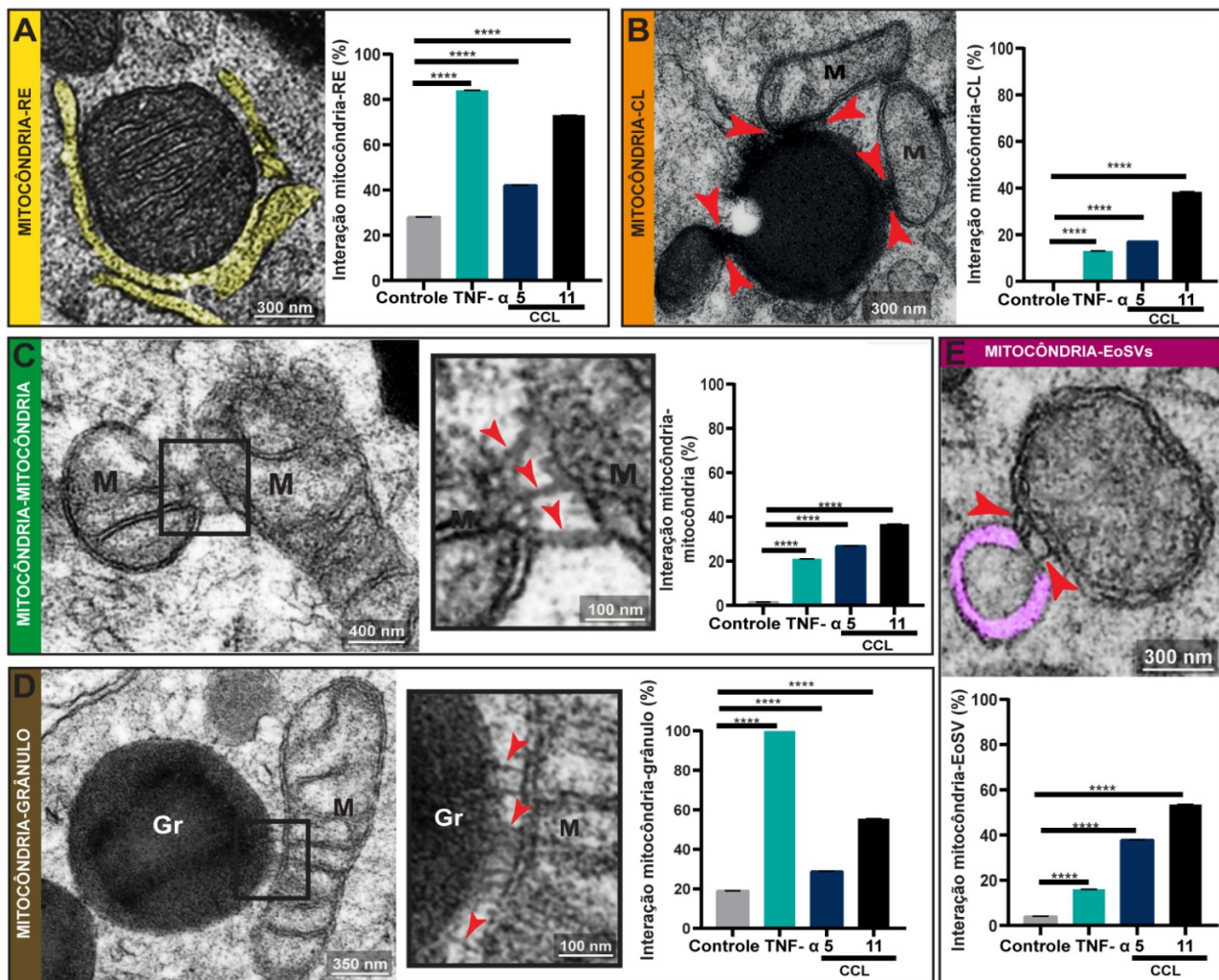


Figura 17. Interações Mitocondriais após a Estimulação In Vitro por TNF- α , CCL5 e CCL11. (A) A interação mitocôndria-RE aumenta após a estimulação por TNF- α , CCL5 e CCL11. Note que as cisternas de RE foram coloridas artificialmente em amarelo e que elas estão em contato direto com a membrana mitocondrial externa. (B) A interação mitocôndria-CL é observada no citoplasma de eosinófilos após a estimulação por TNF- α , CCL5 e CCL11. Cabeças de seta vermelhas apontam a ocorrência de pontes moleculares (*tethers*) durante a interação de mitocôndrias e CLs. (C) A interação mitocôndria-mitocôndria é observada no citoplasma de eosinófilos após a estimulação por TNF- α , CCL5 e CCL11. O destaque na imagem evidencia a formação de amplas pontes moleculares entre mitocôndrias em interação. (D) A interação mitocôndria-grânulo é observada no citoplasma de eosinófilos após a estimulação por TNF- α , CCL5 e CCL11. O destaque apresenta a formação de *tethers*, apontadas pelas setas vermelhas durante a interação entre mitocôndria-grânulo. (E) EoSV (destacada em rosa) em interação com mitocôndria. A interação entre mitocôndria-EoSvs aumenta após a estimulação por citocinas. Cabeça de seta vermelha indica a formação de *tether*. O total de 507 mitocôndrias foram avaliados em alta resolução em 84 eosinófilos provenientes de pelo menos 3 pacientes saudáveis em 3 experimentos independentes. M, mitocôndria; Gr, grânulo secretor. Resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. (**** $P < 0,0001$).

O microambiente tecidual inflamado (sinusal e intestinos) durante doenças eosinofílicas (DC, RCU e RCE), também levou as mitocôndrias de eosinófilos infiltrados a estabelecerem interações com outras organelas. As análises ultraestruturais qualitativas mostraram locais de contato de membrana entre mitocôndrias e outras organelas, além de projeções inter-membranas (*tethers*),

conforme visualizado in vitro. As interações foram tanto homotípicas (mitocôndria-mitocôndria) quanto heterotípicas (mitocôndria-grânulos secretores, mitocôndria-RE, mitocôndria-CLs e mitocôndria-EoSVs) (Figura 18).

As análises quantitativas mostraram que o contexto de doenças leva a um aumento significativo nas interações mitocondriais com todas as organelas analisadas em comparação ao controle, exceto na interação mitocôndria-RE na RCU (interação mitocôndria-RE: controle = $28\% \pm 0,025$; DC = $25,4\% \pm 0,05$; RCU = $28,5\% \pm 0,05$; RCE = $50,5\% \pm 0,05$; média $\pm$ SEM; $P < 0,05$; Figura 18A; interação mitocôndria-CLs: controle = 0 ± 0 ; DC: $3,4\% \pm 0,06$; RCU = $1,4\% \pm 0,005$; RCE = $11,8\% \pm 0,03$; média $\pm$ SEM; $P < 0,05$; Figura 18B; interação mitocôndria-mitocôndria: controle = $1,4\% \pm 0,06$; DC: $6,9\% \pm 0,08$; RCU = $22,9\% \pm 0,01$; RCE = $26,9\% \pm 0,04$; média $\pm$ SEM; $P < 0,05$; Figura 18C; interação mitocôndria-grânulos: controle = $19\% \pm 0,02$; DC = $46,9\% \pm 0,05$; RCU = $22,4\% \pm 0,003$; RCE = $41,2\% \pm 0,05$; média $\pm$ SEM; $P < 0,05$; Figura 18D; interação mitocôndria-EoSVs: controle = $4\% \pm 0,01$; DC = $7,9\% \pm 0,12$; RCU = $6,9\% \pm 0,03$; RCE = $32,4\% \pm 0,05$ média $\pm$ SEM; $P < 0,05$; Figura 18E).

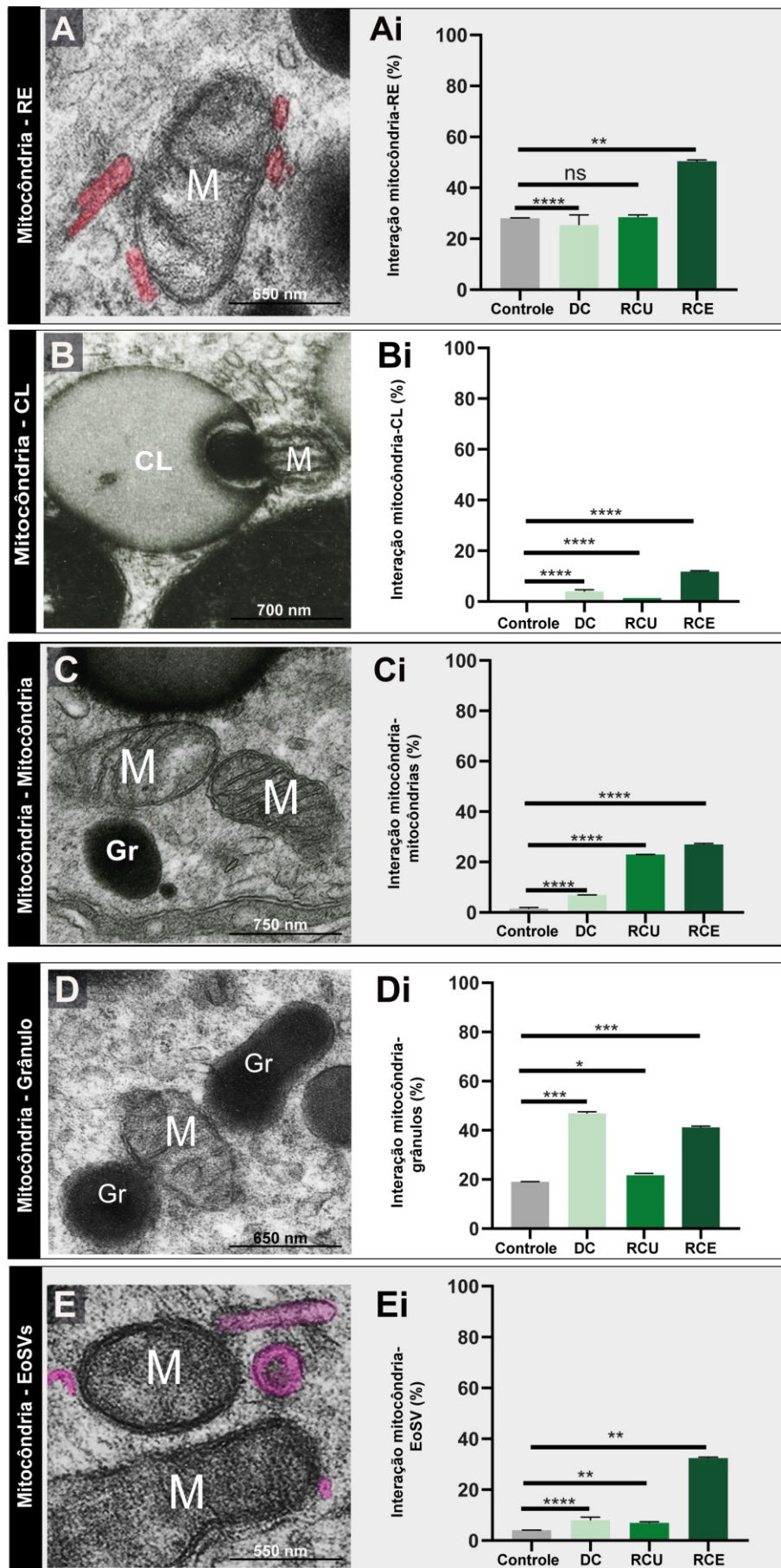


Figura 18. Interações Mitocondriais em Doenças Eosinofílicas. (A) A interação mitocôndria-RE aumenta significativamente (Ai) nos contextos de DC e RCE. As cisternas de RE foram artificialmente coloridas em vermelho. Note o contato entre a membrana externa mitocondrial e a membrana do RE. (B) A interação entre mitocôndria e CL (Bi) aumenta significativamente nos contextos de DC, RCU e RCE. (C) A interação mitocôndria-mitocôndria (Ci) aumenta significativamente nos contextos de DC, RCU e RCE. (D) A interação mitocôndria-grânulo (Di) aumenta significativamente nos contextos de DC, RCU e RCE. (E) A interação entre mitocôndria-EoSVs aumenta significativamente nos contextos de DC, RCU e RCE. Note que as EoSVs foram coloridas artificialmente em rosa. O total de 511 mitocôndrias foram avaliados em alta resolução em 82 eosinófilos advindos de pacientes com DC, RCU e RCE. M, mitocôndria; CL, corpúsculo lipídico; Gr, grânulo secretor. Resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. (ns = não significativo; * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

6.5 A Proporção de Interação de Mitocôndrias com Outras Organelas se Altera de Acordo com o Contexto de Ativação de Eosinófilos

Depois de avaliarmos a proporção de interações de mitocôndrias com cada organela de eosinófilos estimulados, comparamos o número total de interações mitocondriais inter-organelares entre os diferentes grupos estimulados *in vitro* e controle. Observamos um aumento significativo do número de interações inter-organelares mitocondriais em todos os grupos em comparação ao controle (controle = $122,0 \pm 3$; TNF- α = $219,0 \pm 3$; CCL5 = 177 ± 6 ; CCL11 = $226,0 \pm 2$; média $\pm$ SEM; $P < 0,05$; Figura 19A). Este resultado revela a natureza altamente dinâmica das mitocôndrias de eosinófilos em situações inflamatórias, além de indicar o remodelamento das interações mitocondriais de acordo com o estímulo.

A partir desses resultados, nos perguntamos ainda se mudanças no tipo de interação estaria ocorrendo em função de cada estímulo. Para responder, avaliamos a distribuição da interação mitocôndria-organela em cada grupo (Figura 19B). Curiosamente, observamos mudanças nos padrões de interação inter-organelar, em cada um dos grupos. Vimos que o grupo controle tem maior proporção de interações mitocondriais com RE, comparado aos grupos estimulados na qual essa interação tem proporção diminuída em contraste ao aumento de interação mitocondrial com grânulos específicos de eosinófilos. Destaca-se ainda um aumento considerável na proporção de interações entre mitocôndrias com CLs e EoSVs, uma

vez que essas organelas são classicamente classificadas como marcadores inflamatórios.

Essas alterações nas proporções de interações nos padrões observados indicam que em contextos inflamatórios mitocôndrias podem moldar e modificar seus padrões de interação. No geral, esses resultados indicam que as mitocôndrias de eosinófilos sofrem mudanças notavelmente importantes no padrão e na dinâmica de interações inter-organelares, especialmente mitocôndrias-CLs e mitocôndrias-EoSVs, que podem ser consideradas como marcadores inflamatórios de eosinófilos.

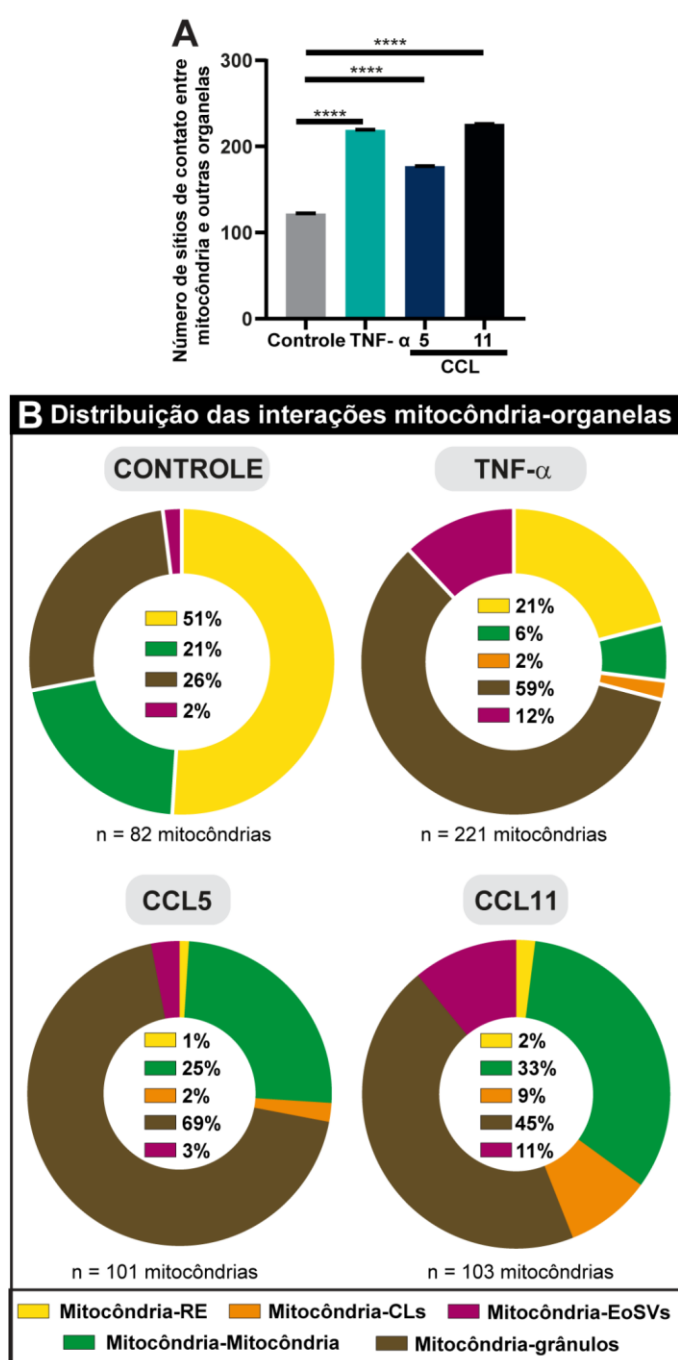


Figura 19. Distribuição das Interações entre Mitocôndrias e Outras Organelas de Eosinófilos Estimulados In Vitro por TNF- α , CCL5 e CCL11. (A) O número de sítios de contato entre mitocôndrias e outras organelas aumenta após o estímulo in vitro por TNF- α , CCL5 e CCL11. (B) Distribuição das interações entre mitocôndrias e outras organelas. Em eosinófilos controles (maduros), mitocôndrias interagem preferencialmente com RE. Em eosinófilos estimulados por TNF- α , mitocôndrias interagem preferencialmente com grânulos específicos e RE. Eosinófilos estimulados por CCL5 e CCL11 interagem preferencialmente com grânulos específicos e outras mitocôndrias. Note o surgimento de interações mitocôndria-CLs em eosinófilos estimulados por TNF- α , CCL5 e CCL11 que não foram observados no grupo controle e o aumento na interação mitocôndria-EoSVs nos grupos estimulados em comparação ao controle. O total de 507 mitocôndrias foram avaliados em alta resolução em 84 eosinófilos provenientes de pelo menos 3 pacientes saudáveis em 3 experimentos independentes. Resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão. (**** $P < 0,0001$).

Em seguida, avaliamos o número de interações entre mitocôndrias e outras organelas no citoplasma de eosinófilos envolvidos em doenças eosinofílicas (DC, RCU e RCE) por análises quantitativas de MET. Observamos um aumento significativo no número de interações inter-organelares mitocondriais em todos os grupos em comparação ao controle (controle = $122,0 \pm 0,03$; DC = $239,0 \pm 0,05$; RCU = $287,0 \pm 0,04$; RCE = $256 \pm 0,07$; média $\pm$ SEM, $P < 0,05$; Figura 20A). Este resultado confirma que as mitocôndrias de eosinófilos no contexto destas doenças respondem ao meio inflamatório com estabelecimento de contatos físicos com outras organelas citoplasmáticas.

A avaliação da distribuição da interação mitocôndria-organela em cada doença eosinofílica revelou que a proporção de cada tipo de interação pode variar ou não em função da doença (Figura 20B). Ocorreu uma diminuição considerável na proporção de interações mitocôndria-RE e mitocôndria-mitocôndria em DC e RCU. Esses tipos de interações, no entanto, não alteraram em termos de proporção durante a RCE em comparação ao controle. Em contraste, as interações mitocôndria-grânulos secretoras e mitocôndria-EoSVs aumentaram notavelmente,

além do surgimento de interações mitocôndria-CLs em doenças o que não aparece no grupo controle.

Em conjunto, nossos resultados indicam que as mitocôndrias de eosinófilos sofrem mudanças significativas em sua dinâmica e interações inter-organelares, especialmente mitocôndrias-CLs e mitocôndrias-EoSVs. Considerando que tanto CLs quanto EoSVs são considerados marcadores da ativação de eosinófilos, nossos dados mostram que a inflamação eosinofílica também leva a um aumento das interações das mitocôndrias com essa organela (CL) e sistema vesicular (EoSV). Esse fato indica a participação de mitocôndrias no processo de ativação de eosinófilos em respostas inflamatórias.

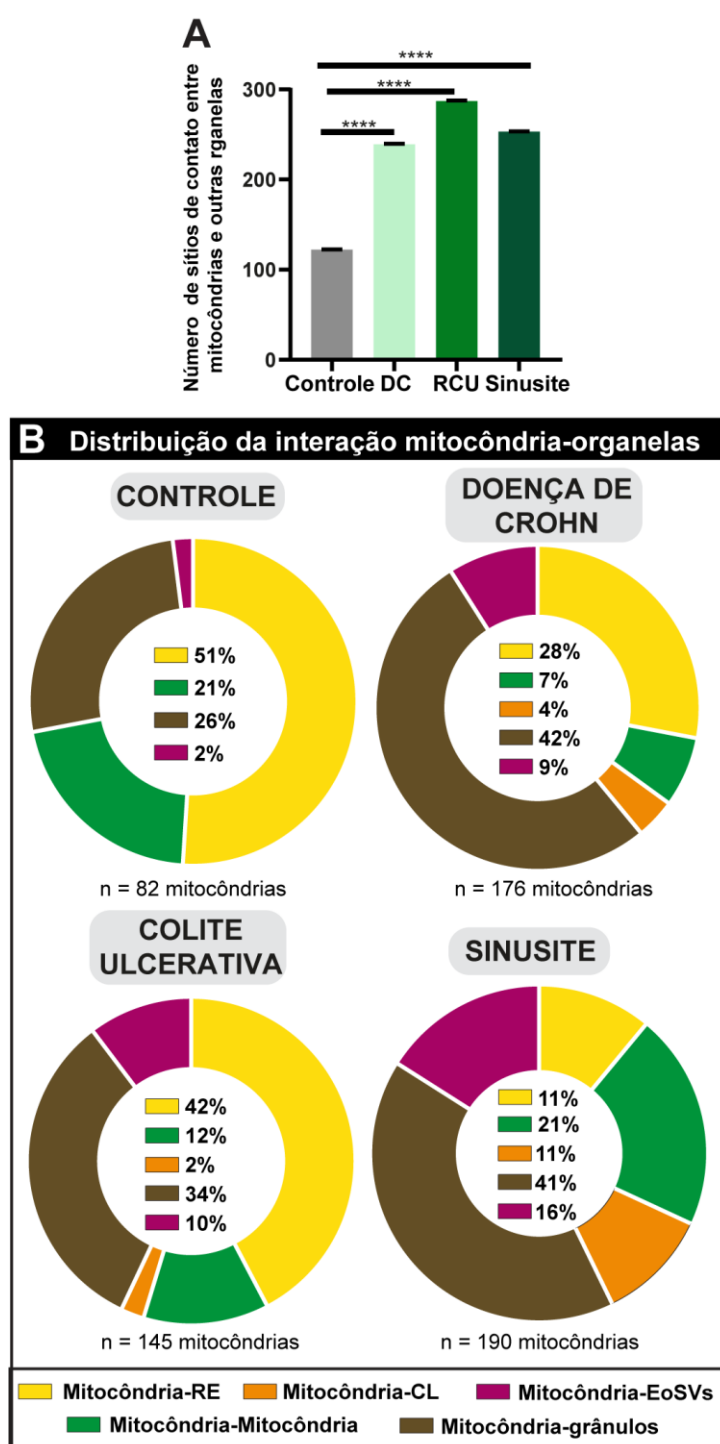


Figura 20. Distribuição das Interações entre Mitocôndrias e Outras Organelas de Eosinófilos nos Contextos de DC, RCU e RCE. (A) O número de sítios de contato entre mitocôndrias e outras organelas aumenta em contextos de DC, RCU e RCE. (B) Distribuição das interações entre mitocôndrias e outras organelas. Em eosinófilos controles (maduros), mitocôndrias interagem preferencialmente com RE. Em eosinófilos no contexto de DC e RCU, mitocôndrias interagem preferencialmente com grânulos específicos e RE. Em eosinófilos provenientes do contexto de RCE, mitocôndrias interagem preferencialmente com grânulos específicos e outras mitocôndrias. No total 11 mitocôndrias foram avaliadas em alta resolução em 82 eosinófilos advindos de pacientes com DC, RCU e RCE. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão (**** $P < 0,0001$).

7 DISCUSSÃO

A MET é a técnica de escolha para visualizar em detalhes a arquitetura das mitocôndrias, incluindo seu tamanho, forma das cristas, interações com outras organelas e mudanças morfológicas no citoplasma da célula durante diferentes condições [revisado em (Duranova, Valkova et al. 2020, Glancy, Kim et al. 2020)]. Neste trabalho, analisamos em detalhe a ultraestrutura mitocondrial de eosinófilos humanos i) isolados do sangue e estimulados por citocinas clássicas de ativação inflamatória (TNF- α , CCL-5, CCL-11); ii) em tecidos de doenças inflamatórias eosinofílicas (DC, RCU e RCE).

Nossos resultados mostraram em eosinófilos inflamatórios que: 1) a população mitocondrial sofre alterações em número e volume (área) em contextos de ativação tanto in vitro como in vivo; 2) em resposta à ativação, as cristas mitocondriais aumentam em volume e se remodelam preferencialmente para a morfologia lamelar e mista; 3) a remodelação das cristas é um evento consistente em todas as condições inflamatórias; 4) o número e o volume das cristas mitocondriais podem aumentar em resposta a estímulos in vitro e em doenças inflamatórias, influenciado pelo microambiente tecidual; 5) a interação celular de mitocôndrias com outras organelas citoplasmáticas constitui fenômeno marcante durante a ativação de eosinófilos tanto in vitro como em doenças eosinofílicas; e 6) os sítios de contato interorganelares aumentam principalmente com grânulos secretores e com organelas consideradas marcadores inflamatórios (CLs e EoSVs), o que indica rearranjo mitocondrial em resposta ao processo inflamatório.

Em geral, células maduras do sistema imunológico, incluindo eosinófilos (Peachman, Lyles et al. 2001), são consideradas células com poucas mitocôndrias no citoplasma (Campello and Scorrano 2010). No entanto, essa população mitocondrial parece estar ativamente participando das atividades imunes dos eosinófilos. Demonstramos aqui que eosinófilos humanos sob efeito da ativação inflamatória, tanto in vitro por citocinas como in vivo em doenças, apresentam alterações no número e área de suas mitocôndrias (Figuras 13 e 14). O remodelamento mitocondrial é também claramente observado na mudança do padrão morfológico e no número de cristas (Figuras 15 e 16). Em eosinófilos

ativados, ocorre aumento do número de cristas e aparece o padrão morfológico misto (lamelar e tubular), ausente no grupo controle (Figuras 15 e 16).

Qual o significado do remodelamento mitocondrial? As cristas mitocondriais são cruciais para as mitocôndrias. Esses compartimentos especializados da membrana interna mitocondrial estão intimamente relacionados ao desempenho respiratório das mitocôndrias porque reações químicas específicas e diferentes complexos de proteínas são montados em sua extensão. É reconhecido que a forma, o número, o volume e as dimensões das cristas mitocondriais estão diretamente correlacionados com a adaptação metabólica [revisado em (Cogliati, Enriquez et al. 2016, Joubert and Puff 2021)]. Desta forma, classicamente, aumento da massa mitocondrial, do número de cristas e do volume das cristas, são considerados eventos interligados com o desempenho respiratório da célula (Cogliati, Enriquez et al. 2016).

No presente trabalho, a identificação de remodelamento mitocondrial em resposta à inflamação, expande o conhecimento sobre o papel das mitocôndrias. A rede equilibrada de vias de sinalização envolvidas na ativação de eosinófilos, a qual abrange citocinas importantes como TNF- α , CCL-5 e CCL11 (Weller and Spencer 2017) parece modular a população de mitocôndrias. Isso significa que as mitocôndrias de eosinófilos são responsivas a uma situação de estresse metabólico no contexto do processo inflamatório. Durante este processo, os eosinófilos sofrem um aumento no volume das cristas *in vitro* (Figura 15), enquanto no microambiente do tecido o volume pode aumentar ou diminuir dependendo da doença (Figura 16). Nossos dados coincidem com aqueles vistos em um estudo conduzido com eosinófilos do sangue periférico humano sinalizando que essas células são “metabolicamente flexíveis” com alta adaptabilidade e distintas demandas de energia (Porter, Toepfner et al. 2018). No entanto, é importante destacar que a bioenergética dos eosinófilos em humanos, ainda é pouco compreendida.

Nossos achados ultraestruturais revelaram que, uma vez que os eosinófilos estão sob estímulos inflamatórios do tecido, sua massa de mitocôndrias aumenta (Figura 14) enquanto suas cristas sofrem remodelação (Figura 16). Todas as doenças inflamatórias levaram a mudanças no formato das cristas. Em geral, em resposta à inflamação tecidual, o número de cristas lamelares diminuiu com um aumento paralelo de cristas mistas, um padrão morfológico caracterizado por cristas

lamelares e tubulares (Figura 15). No entanto, as proporções de mitocôndrias com cristas lamelares, tubulares e mistas variam dependendo do microambiente, indicando, portanto, que a dinâmica das mitocôndrias é responsiva ao meio circundante. Nossos dados estão de acordo com um trabalho anterior que mostrou haver mudanças estruturais de cristas mitocondriais associadas a leucócitos ativados (Buck, O'Sullivan et al. 2016). Embora não possamos indicar quais são as vias de sinalização subjacentes à remodelação de cristas induzida por inflamação, nossas descobertas implicam respostas inflamatórias de eosinófilos com impactos na dinâmica mitocondrial. Como a remodelação de cristas mitocondriais dentro de eosinófilos humanos influencia suas funções imunológicas constitui questão em aberto a ser abordada em estudos futuros.

Interações entre mitocôndrias com outras organelas têm recebido grande interesse na literatura porque servem como um modo de regular as funções celulares (Angajala, Lim et al. 2018). Embora a MET tenha a limitação de depender de observações estáticas, ela permite distinguir entre membranas contíguas e quantificar com precisão a morfologia e as interações mitocondriais (Picard and McEwen 2014). Uma das interações mitocondriais mais reconhecidas é com o RE dentro de diferentes tipos de células (Csordás, Renken et al. 2006) incluindo células imunes [revisado em (Angajala, Lim et al. 2018)]. Por exemplo, em células T, já foi observado que essa interação RE-mitocôndrias permite a reprogramação metabólica necessária para respostas imunes (Buck, O'Sullivan et al. 2016). Em eosinófilos, as interações mitocondriais são mal compreendidas. Aqui, identificamos que durante eventos de ativação de eosinófilos, a interconectividade das mitocôndrias com outras organelas (mitocôndria-RE, mitocôndria-mitocôndria, mitocôndria-grânulos, mitocôndria-CL e mitocôndria-EoSV) é significativamente maior em eosinófilos envolvidos em contextos de ativação por estímulos *in vitro* em comparação com o grupo controle (Figura 17). O mesmo ocorre em eosinófilos teciduais em doenças inflamatórias (Figuras 18), com a importante implicação que interações interorganelares das mitocôndrias são necessárias para as respostas inflamatórias de eosinófilos (Figura 19 e 20).

A literatura científica reconhece a importância das interações de mitocôndrias e CLs. Já foi visto que proximidade das mitocôndrias às CLs tem sido amplamente observada por MET e imunofluorescência em tecidos metabólicos ativos, como

fígado, tecido adiposo marrom e músculo (Aydin, 2025; Upadhyay, 2025). As interações dinâmicas entre essas organelas permitem a translocação de ácidos graxos derivados da lipólise dos CLs para as mitocôndrias, para a β -oxidação de ácidos graxos (FAO), em adaptação a várias condições patológicas, sendo frequentemente associadas a produção de mediadores inflamatórios. Estudos recentes apontam que, o metabolismo desregulado dos CLs pode levar ao comprometimento da função mitocondrial em algumas doenças inflamatórias (Teixeira, 2024).

As interações entre mitocôndrias e EoSVs, aqui identificadas pela primeira vez em eosinófilos humanos, podem ter significado funcional importante em mecanismos de transporte de mediadores imunes. EoSVs constituem um sistema vesicular diretamente envolvido no transporte de produtos armazenados nos grânulos secretores. O aumento dos contatos EoSVs-mitocôndrias nos diferentes contextos estudados (Figuras 17-20) sugere a participação mitocondrial em mediação e modulação de resposta inflamatória de eosinófilos humanos em acordo com estudos prévios em modelos experimentais de doenças (Bonjour, Palazzi, 2022).

Os contatos de membrana das mitocôndrias com grânulos secretores, bem como ligações estruturais na interface mitocôndria-grânulos (Figuras 17 e 18) foram surpreendentemente detectados no presente trabalho. Essas interações, principalmente aquelas observadas com grânulos em processo de esvaziamento de seus conteúdos sugerem um papel regulador para as mitocôndrias na desgranulação associada com a resposta inflamatória (Figuras 17 e 18). (Bonjour, Palazzi, 2022). Considerando que as funções imunes de eosinófilos são diretamente relacionadas com sua atividade secretora, esses achados são particularmente importantes porque indicam que as mitocôndrias também participam das respostas imunes.

Em conjunto, nossos achados demonstram que as mitocôndrias de eosinófilos sofrem modificações morfofuncionais para se adaptar e responder ao microambiente inflamatório (figura 21). Isso é importante para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação dessas células e de suas respostas imunes no contexto de doenças.

8 CONCLUSÕES

- A ativação inflamatória interfere na dinâmica e massa da população mitocondrial de eosinófilos humanos;
- As cristas mitocondriais respondem à inflamação com remodelamento de suas cristas (aumento de volume e mudanças de padrões morfológicos);
- A inflamação induz interações mitocondriais interorganelares no citoplasma de eosinófilos, com destaque para as interações mitocôndrias-grânulos secretores, com potencial influência nas respostas imunes secretoras dos eosinófilos;
- As modificações morfofuncionais das mitocôndrias em eosinófilos dependem do microambiente inflamatório em sítios teciduais;
- A compreensão de como a dinâmica mitocondrial contribui para as funções imunes dos eosinófilos é um campo aberto e interessante a ser explorado.

Os principais eventos ocorrendo em mitocôndrias de eosinófilos ativados no contexto da inflamação são sumarizados na Figura 21.

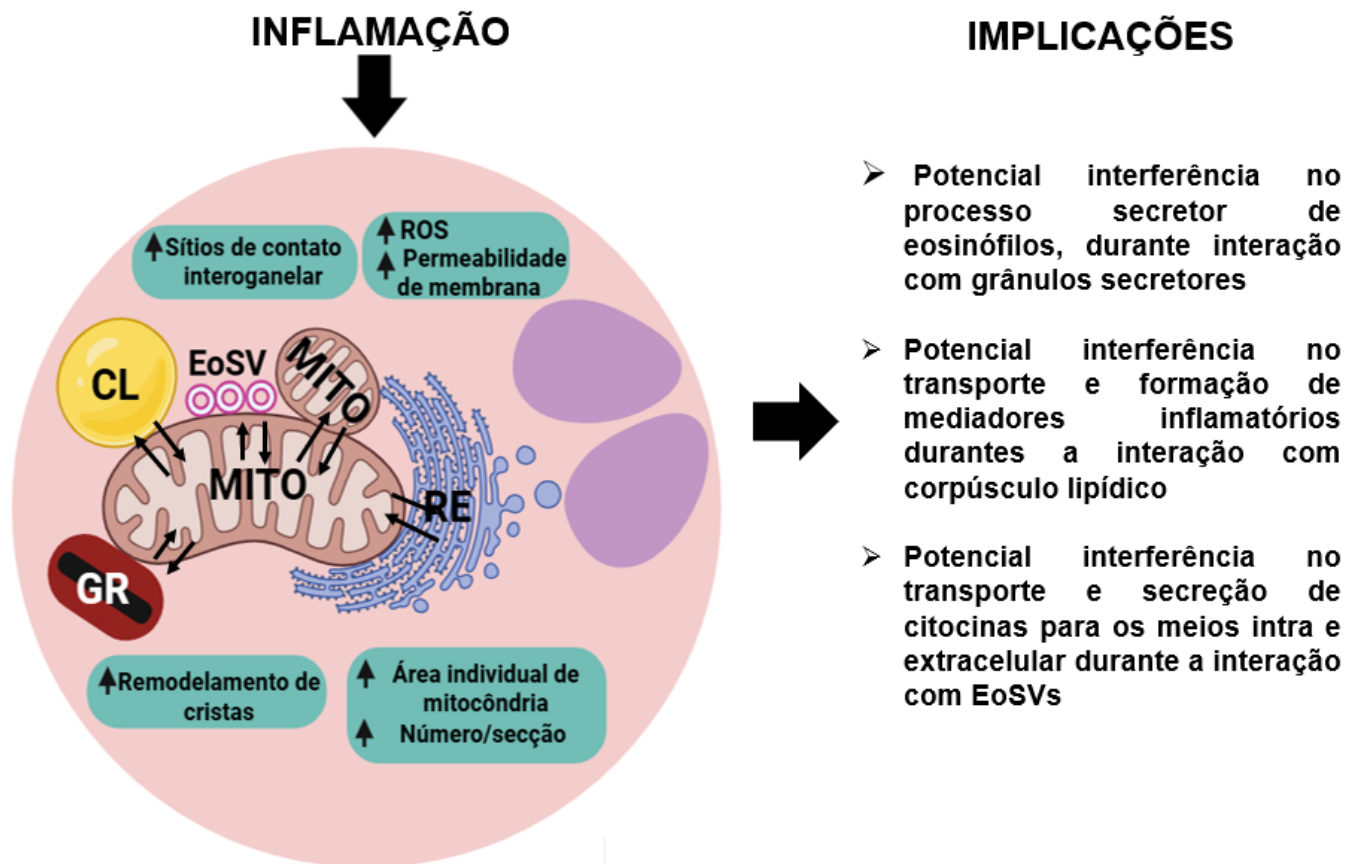


Figura 21. Principais Eventos Ocorridos em Mitocôndrias de Eosinófilos Durante o Processo de Ativação Inflamatória. Corpúsculo lipídico (CL), mitocôndria (MITO), grânulos específicos (GR), retículo endoplasmático (RE), vesículas “sombbrero” de eosinófilos (EoSV). Criado por biorender.com.

9 REFERÊNCIAS

Akuthota, P., et al. (2016). "Extracellular microvesicle production by human eosinophils activated by "inflammatory" stimuli." Frontiers in cell and developmental biology **4**: 117.

Angajala, A., et al. (2018). "Diverse roles of mitochondria in immune responses: novel insights into immuno-metabolism." Frontiers in immunology **9**: 1605.

Bahat, A., et al. (2021). "Metabolism and innate immunity meet at the mitochondria." Frontiers in Cell and Developmental Biology **9**: 720490.

Biswal, S., et al. (2025). "Shikonin Stimulates Mitochondria-Mediated Apoptosis by Enhancing Intracellular Reactive Oxygen Species Production and DNA Damage in Oral Cancer Cells." Journal of Cellular Biochemistry **126**(1): e30671.

Bonjour, K., et al. (2022). "Mitochondrial population in mouse eosinophils: ultrastructural dynamics in cell differentiation and inflammatory diseases." Frontiers in Cell Developmental Biology **10**: 836755.

Breda, C. N. d. S., et al. (2019). "Mitochondria as central hub of the immune system." Redox biology **26**: 101255.

Buck, M. D., et al. (2016). "Mitochondrial dynamics controls T cell fate through metabolic programming." Cell **166**(1): 63-76.

Campello, S. and L. Scorrano (2010). "Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology." EMBO reports **11**(9): 678-684.

Cao, Z., et al. (2022). "Roles of mitochondria in neutrophils." Frontiers in immunology **13**: 934444.

Carmo, L. A., et al. (2018). "Single-cell analyses of human eosinophils at high resolution to understand compartmentalization and vesicular trafficking of interferon-gamma." Frontiers in immunology **9**: 1542.

Carmo, L. A., et al. (2016). "CD63 is tightly associated with intracellular, secretory events chaperoning piecemeal degranulation and compound exocytosis in human eosinophils." Journal of Leucocyte Biology **100**(2): 391-401.

Carvalho, A. T. P., et al. (2003). "Immunohistochemical study of intestinal eosinophils in inflammatory bowel disease." Journal of clinical gastroenterology **36**(2): 120-125.

Cervantes-Silva, M. P., et al. (2021). "Alterations in mitochondrial morphology as a key driver of immunity and host defence." EMBO reports **22**(9): e53086.

Chen, H. and D. C. Chan (2017). "Mitochondrial dynamics in regulating the unique phenotypes of cancer and stem cells." Cell metabolism **26**(1): 39-48.

Chopra, D., et al. (2024). Overview of Inflammation. Inflammation Resolution and Chronic Diseases, Springer: 1-18.

Cogliati, S., et al. (2016). "Mitochondrial cristae: where beauty meets functionality." Trends in biochemical sciences **41**(3): 261-273.

Csordás, G. r., et al. (2006). "Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria." The Journal of cell biology **174**(7): 915-921.

Duranova, H., et al. (2020). "Mitochondria: A worthwhile object for ultrastructural qualitative characterization and quantification of cells at physiological and pathophysiological states using conventional transmission electron microscopy." Acta Histochemica **122**(8): 151646.

Erjefalt, J. S., et al. (1999). "Allergen-induced eosinophil cytotoxicity is a primary mechanism for granule protein release in human upper airways." American journal of respiratory critical care medicine **160**(1): 304-312.

Faas, M. M. and P. De Vos (2020). "Mitochondrial function in immune cells in health and disease." Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Basis of Disease **1866**(10): 165845.

Fujieda, S., et al. (2019). "Eosinophilic chronic rhinosinusitis." Allergology international **68**(4): 403-412.

Galloway, C. A., et al. (2012). "Mitochondrial morphology—emerging role in bioenergetics." Free Radical Biology Medicine **53**(12): 2218-2228.

Giacomello, M., et al. (2020). "The cell biology of mitochondrial membrane dynamics." Nature reviews Molecular cell biology **21**(4): 204-224.

Glancy, B., et al. (2020). "The functional impact of mitochondrial structure across subcellular scales." Frontiers in physiology **11**(1): 541040.

Glover, H. L., et al. (2024). "Mitochondria and cell death." Nature cell biology **26**(9): 1434-1446.

Haas, R. and Z. Zolkipli (2014). Mitochondrial disorders affecting the nervous system. Seminars in neurology, Thieme Medical Publishers.

Hogan, S. P., et al. (2004). "Chemokines in eosinophil-associated gastrointestinal disorders." Current Allergy Asthma Reports **4**: 74-82.

Horvath, S. E. and G. Daum (2013). "Lipids of mitochondria." Progress in lipid research **52**(4): 590-614.

Iwasaki, Y., et al. (2020). "Basic mechanism of immune system activation by mitochondria." Immunological medicine **43**(4): 142-147.

Jenkins, B. C., et al. (2024). "Mitochondria in disease: changes in shapes and dynamics." Trends in biochemical sciences **49**(4): 346-360.

Joubert, F. and N. Puff (2021). "Mitochondrial cristae architecture and functions: lessons from minimal model systems." Membranes **11**(7): 465.

Kalinovic, S., et al. (2019). "Comparison of mitochondrial superoxide detection ex vivo/in vivo by mitoSOX HPLC method with classical assays in three different animal models of oxidative stress." Antioxidants Redox Signaling **8**(11): 514.

Kato, K., et al. (2011). "Infliximab therapy impacts the peripheral immune system of immunomodulator and corticosteroid naive patients with Crohn's disease." Gut liver **5**(1): 37.

Katsanos, K. H., et al. (2011). "Eosinophilic-Crohn overlap colitis and review of the literature." Journal of Crohn's Colitis **5**(3): 256-261.

Kawano, I., et al. (2023). "Mitochondrial dynamics and cristae shape changes during metabolic reprogramming." Antioxidants Redox Signaling **39**(10-12): 684-707.

Kennedy, J. L. and L. Borish (2013). "Chronic sinusitis pathophysiology: the role of allergy." American journal of rhinology allergy **27**(5): 367-371.

Klion, A. D., et al. (2020). "Contributions of eosinophils to human health and disease." Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease **15**(1): 179-209.

Koranteng, J., et al. (2024). "The role of mitochondria in eosinophil function: implications for severe asthma pathogenesis." Frontiers in Cell Developmental Biology **12**: 1360079.

Lampinen, M., et al. (2008). "Different regulation of eosinophil activity in Crohn's disease compared with ulcerative colitis." Journal of Leukocyte Biology **84**(6): 1392-1399.

Logan, M. R., et al. (2002). "Expression of eosinophil target SNAREs as potential cognate receptors for vesicle-associated membrane protein-2 in exocytosis." Journal of allergy and clinical immunology **109**(2): 299-306.

Loktionov, A. (2019). "Eosinophils in the gastrointestinal tract and their role in the pathogenesis of major colorectal disorders." World journal of gastroenterology **25**(27): 3503.

Madan, S., et al. (2022). "Mitochondria lead the way: mitochondrial dynamics and function in cellular movements in development and disease." Frontiers in Cell Developmental Biology **9**: 781933.

Marchi, S., et al. (2023). "Mitochondrial control of inflammation." Nature Reviews Immunology **23**(3): 159-173.

Marin, W., et al. (2021). "Mitochondria as a therapeutic target for cardiac ischemia-reperfusion injury." International Journal of Molecular Medicine **47**(2): 485-499.

Masterson, J. C., et al. (2021). "Heterogeneity of intestinal tissue eosinophils: Potential considerations for next-generation eosinophil-targeting strategies." Cells **10**(2): 426.

Melo, R. C., et al. (2005). "Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils." Traffic **6**(10): 866-879.

Melo, R. C., et al. (2009). "Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein." Laboratory investigation **89**(7): 769-781.

Melo, R. C. and P. F. Weller (2010). "Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses." Histology and histopathology **25**(10): 1341.

Melo, R. C. N., et al. (2022). Eosinophil Ultrastructure: Atlas of Eosinophil Cell Biology and Pathology, Academic Press.

Melo, R. C. N. and M. E. e Rothenberg (2025). "Imaging eosinophil secretory granules: from storage containers to active, immune responder organelles." Journal of Allergy Clinical Immunology.

Melo, R. C. N. and M. E. Rothenberg (2024). "Imaging eosinophil secretory granules: from storage containers to active, immune responder organelles." Journal of Allergy Clinical Immunology.

Melo, R. C. N. and T. P. Silva (2024). "Eosinophil activation during immune responses: an ultrastructural view with an emphasis on viral diseases." Journal of Leukocyte Biology: qiae058.

Melo, R. C. N., et al. (2008). "Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins." Journal of Leukocyte Biology **83**(2): 229-236.

Melo, R. C. N. and P. F. Weller (2014). "Unraveling the complexity of lipid body organelles in human eosinophils." Journal of Leukocyte Biology **96**(5): 703-712.

Melo, R. C. N. and P. F. Weller (2016). "Vesicular trafficking of immune mediators in human eosinophils revealed by immunoelectron microscopy." Experimental cell research **347**(2): 385-390.

Migliorisi, G., et al. (2024). "Eosinophils, eosinophilic gastrointestinal diseases, and inflammatory bowel disease: a critical review." Journal of Clinical Medicine **13**(14): 4119.

Mills, E. L., et al. (2016). "Repurposing mitochondria from ATP production to ROS generation drives a pro-inflammatory phenotype in macrophages that depends on succinate oxidation by complex II." Cell **167**(2): 457.

Mills, E. L., et al. (2016). "Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages." Cell **167**(2): 457-470. e413.

Miyabe, Y., et al. (2021). "Eosinophil-mediated inflammation in the absence of eosinophilia." Asia Pacific Allergy **11**(3): e30.

Mota-Rojas, D., et al. (2021). "Physiological and behavioral mechanisms of thermoregulation in mammals." Animals **11**(6): 1733.

Neves, J. S., et al. (2009). "Subcellular fractionation of human eosinophils: isolation of functional specific granules on isoosmotic density gradients." Journal of immunological methods **344**(1): 64-72.

Oliveira, S. H. P. and N. W. Lukacs (2003). "The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions." Brazilian Journal of Medical Biological Research **36**: 1455-1463.

Patergnani, S., et al. (2021). "Mitochondrial oxidative stress and "mito-inflammation": actors in the diseases." Biomedicine **9**(2): 216.

Peachman, K. K., et al. (2001). "Mitochondria in eosinophils: functional role in apoptosis but not respiration." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(4): 1717-1722.

Persson, C. and L. Uller (2014). "Theirs but to die and do: primary lysis of eosinophils and free eosinophil granules in asthma." American journal of respiratory

critical care medicine **189**(6): 628-633.

Picard, M. and B. S. McEwen (2014). "Mitochondria impact brain function and cognition." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(1): 7-8.

Porter, L., et al. (2018). "Metabolic profiling of human eosinophils." Frontiers in immunology **9**: 1404.

Robin, E. D. and R. Wong (1988). "Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells." Journal of cellular physiology **136**(3): 507-513.

Rodrigo-Muñoz, J. M., et al. (2024). "Eosinophil-derived extracellular vesicles: isolation and classification techniques and implications for disease pathophysiology." Journal of Leukocyte Biology **116**(2): 260-270.

Sahli, W., et al. (2025). "Eosinophils and COVID-19: Insights into immune complexity and vaccine safety." Clinical and Translational Allergy **15**(3): e70050.

Salcedo, R., et al. (2001). "Eotaxin (CCL11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells." The Journal of Immunology **166**(12): 7571-7578.

Sebag, S. C., et al. (2017). "Mitochondrial CaMKII inhibition in airway epithelium protects against allergic asthma." JCI insight **2**(3).

Sena, L. A., et al. (2013). "Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling." Immunity **38**(2): 225-236.

Shah, S. A., et al. (2016). "Pathogenesis of eosinophilic chronic rhinosinusitis." Journal of inflammation **13**: 1-9.

Shahana, S., et al. (2005). "Ultrastructure of bronchial biopsies from patients with allergic and non-allergic asthma." Respiratory medicine **99**(4): 429-443.

Spencer, L. A., et al. (2014). "Eosinophil secretion of granule-derived cytokines." Frontiers in immunology **5**: 496.

Su, Y.-J., et al. (2021). "The role of mitochondria in immune-cell-mediated tissue regeneration and ageing." International Journal of Molecular Sciences **22**(5): 2668.

Trinchese, G., et al. (2024). "Mitochondria: the gatekeepers between metabolism and immunity." Frontiers in Immunology **15**: 1334006.

Vincent, A. E., et al. (2016). "Mitochondrial dysfunction in myofibrillar myopathy." Neuromuscular Disorders **26**(10): 691-701.

Vorobjeva, N. V., et al. (2023). "Role of mitochondria in the regulation of effector functions of granulocytes." Cells **12**(18): 2210.

Weihrauch, T., et al. (2024). "Eosinophil extracellular vesicles and DNA traps in allergic inflammation." Frontiers in Allergy **5**: 1448007.

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

Woodruff, S. A., et al. (2011). "Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases." Journal of pediatric gastroenterology nutrition **52**(6): 650-661.

Zhang, L., et al. (2022). "Mitochondria dysfunction in CD8+ T cells as an important contributing factor for cancer development and a potential target for cancer treatment: a review." Journal of Experimental Clinical Cancer Research **41**(1): 227.

10. ANEXOS

10.1 Publicações relacionadas a tese

Publicado na *Frontiers in Microbiology* 6:1202.2015. (CC-BY 4.0 ou 4.1)



Mitochondrial Population in Mouse Eosinophils: Ultrastructural Dynamics in Cell Differentiation and Inflammatory Diseases

Kennedy Bonjour¹, Cinthia Palazzi¹, Thiago P. Silva¹, Kássia K. Malta¹, Vitor H. Neves¹, Eliane G. Oliveira-Barros¹, Igor Neves¹, Victor A. Kersten², Bruno T. Fortuna¹, Amali E. Samarasinghe³, Peter F. Weller⁴, Christianne Bandeira-Melo² and Rossana C. N. Melo^{1,4*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Jyoti K. Jaiswal,
George Washington University,
United States

Reviewed by:

Antenor Hinton,
Vanderbilt University, United States
Carmen A. Mannella,
University of Maryland Medical Center,
United States
Gyorgy Csordas,
Thomas Jefferson University,
United States

*Correspondence:

Rossana C. N. Melo
rossana.melo@ufjf.edu.br

Specialty section:

This article was submitted to
Signaling,
a section of the journal
*Frontiers in Cell and Developmental
Biology*

Received: 15 December 2021

Accepted: 25 February 2022

Published: 21 March 2022

Citation:

Bonjour K, Palazzi C, Silva TP,
Malta KK, Neves VH,
Oliveira-Barros EG, Neves I,
Kersten VA, Fortuna BT,
Samarasinghe AE, Weller PF,
Bandeira-Melo C and Melo RCN
(2022) Mitochondrial Population in
Mouse Eosinophils: Ultrastructural
Dynamics in Cell Differentiation and
Inflammatory Diseases.
Front. Cell Dev. Biol. 10:836755.
doi: 10.3389/fcell.2022.836755

¹Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, ICB, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, Juiz de Fora, Brazil, ²Laboratory of Inflammation, Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ³Division of Pulmonology, Allergy-Immunology and Sleep, Department of Pediatrics, College of Medicine, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, TN, United States, ⁴Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, United States

Mitochondria are multifunctional organelles of which ultrastructure is tightly linked to cell physiology. Accumulating evidence shows that mitochondrial remodeling has an impact on immune responses, but our current understanding of the mitochondrial architecture, interactions, and morphological changes in immune cells, mainly in eosinophils, is still poorly known. Here, we applied transmission electron microscopy (TEM), single-cell imaging analysis, and electron tomography, a technique that provides three-dimensional (3D) views at high resolution, to investigate mitochondrial dynamics in mouse eosinophils developing in cultures as well as in the context of inflammatory diseases characterized by recruitment and activation of these cells (mouse models of asthma, H1N1 influenza A virus (IAV) infection, and schistosomiasis mansoni). First, quantitative analyses showed that the mitochondrial area decrease 70% during eosinophil development (from undifferentiated precursor cells to mature eosinophils). Mitophagy, a consistent process revealed by TEM in immature but not in mature eosinophils, is likely operating in mitochondrial clearance during eosinophilopoiesis. Events of mitochondria interaction (inter-organelle membrane contacts) were also detected and quantitated within developing eosinophils and included mitochondria-endoplasmic reticulum, mitochondria-mitochondria, and mitochondria-secretory granules, all of them significantly higher in numbers in immature compared to mature cells. Moreover, single-mitochondrion analyses revealed that as the eosinophil matures, mitochondria cristae significantly increase in number and reshape to lamellar morphology. Eosinophils did not change (asthma) or reduced (IAV and *Schistosoma* infections) their mitochondrial mass in response to inflammatory diseases. However, asthma and schistosomiasis, but not IAV infection, induced amplification of both cristae numbers and volume in individual mitochondria. Mitochondrial cristae remodeling occurred in all inflammatory conditions with the proportions of mitochondria containing only lamellar or tubular, or mixed cristae (an ultrastructural aspect seen just in tissue eosinophils).

depending on the tissue/disease microenvironment. The ability of mitochondria to interact with granules, mainly mobilized ones, was remarkably captured by TEM in eosinophils participating in all inflammatory diseases. Altogether, we demonstrate that the processes of eosinophilopoiesis and inflammation-induced activation interfere with the mitochondrial dynamics within mouse eosinophils leading to cristae remodeling and inter-organelle contacts. The understanding of how mitochondrial dynamics contribute to eosinophil immune functions is an open interesting field to be explored.

Keywords: eosinophils, mouse, mitochondrial dynamics, mitochondrial architecture, mitochondria ultrastructure, electron tomography, eosinophilopoiesis, mitochondria contact sites

INTRODUCTION

Mitochondria are multifaceted organelles with an architecture extraordinarily interconnected with cellular functions. Mitochondria can change their structure in coordination with both physiological and pathological cellular processes and these alterations influence a plethora of cell signaling pathways such as bioenergetics (Galloway et al., 2012; Bahat and Gross, 2019) and cell fate (Bahat and Gross, 2019). Mitochondria are fascinating organelles considering that they combine high plasticity with continuous cycles of membrane fusion and fission and remarkable ability to establish membrane contacts with other organelles and to work as a cooperative population [reviewed in (Galloway et al., 2012; Chen and Chan, 2017)]. The term mitochondrial dynamics is used to describe structural events of mitochondrial remodeling involving size, shape, activity, trafficking, and inter-organelle interactions within the cell cytoplasm (Cervantes-Silva et al., 2021).

The impact of mitochondrial dynamics in cells from the immune system and in the modulation of immune responses has been addressed (reviewed in (Campello and Scorrano, 2010; Angajala et al., 2018; Cervantes-Silva et al., 2021). For example, T cell activation induces cristae remodeling that regulates metabolism (Buck et al., 2016). Other aspects of the mitochondrial dynamics such as elongation and mitochondria-ER tethering have been recognized as important events related to the innate immune system functional activities (Campello and Scorrano, 2010; Angajala et al., 2018; Cervantes-Silva et al., 2021). However, our current understanding of the mitochondrial architecture, interactions, and morphological changes in immune cells during their development and under homeostatic and pathological conditions is still poorly known, especially in eosinophils.

Our group has been studying ultrastructural mechanisms underlying the functions of eosinophils, cells from the innate immune system, in health and in a wide variety of diseases, both in humans and mouse models [reviewed in (Melo et al., 2008; Melo et al., 2010; Melo and Weller, 2016, 2018; Melo et al., 2022)]. Here, we applied transmission electron microscopy (TEM), single-cell imaging analysis, and electron tomography, a technique that provides three-dimensional (3D) views at high resolution, to investigate mitochondrial dynamics in mouse eosinophils developing in cultures as well as in the context of inflammatory diseases characterized by recruitment and

activation of these cells (mouse models of asthma, H1N1 influenza A virus (IAV), and schistosomiasis mansoni infections). Our findings show that mitochondrial remodeling and inter-organelle interactions, including an undescribed contact with secretory granules, are closely associated with both eosinophilopoiesis and eosinophil inflammatory responses.

MATERIAL AND METHODS

Ethics Statement

This study was carried out in accordance with protocols and guidelines approved by the Animal Care and Use Committees of the following Institutions: Federal University of Rio de Janeiro, Brazil (CEUA-CCS/UFRJ 090/18); Oswaldo Cruz Foundation, Brazil (CEUA/Fiocruz-0213-4/2007; CEUA/Fiocruz 32/2012); and University of Tennessee Health Science Center (UTHSC), United States of America.

Animals

Six-week-old female BALB/c and Swiss Webster mice were obtained from the animal facilities of the Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho (UFRJ, Rio de Janeiro), and Oswaldo Cruz Foundation breeding unit (CECAL/Fiocruz, Rio de Janeiro). Six-week-old female C57BL/6J mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Mice were housed in environmentally controlled conditions (22°C, a 12 h light/dark cycle with the light cycle from 6 a.m. to 6 p.m. and the dark cycle from 6 p.m. to 6 a.m.) and monitored daily for survival and wellbeing status (home cage evaluation, body condition, skin lesions, mobility, and other general conditions). Animals were housed at least 1 week before investigation and all experiments were performed during the light cycle.

Animal Models of Diseases

Asthma Model

BALB/c mice, weighing 20–25 g each and with *ad libitum* access to standard ovalbumin (OVA)-free laboratory chow and water, were immunized subcutaneously on day 0 with 50 µg OVA (grade V; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 5 µg aluminum hydroxide (Sigma) in 200 µL of 0.9% NaCl (sterile saline) as before (Serra et al., 2012). On day 14 after injection, mice were boosted with the same solution above administered intraperitoneally and intranasal OVA challenges (25 µg/25 µL

in saline) were administered on the subsequent 4 weeks (3 times per week) under halothane volatile anesthesia. Sensitized control mice were challenged only with vehicle. Thirty days after the last instillation, animals ($n = 5$) were euthanized in a CO₂ chamber, perfused with 20 ml of sterile PBS to remove blood, and fragments of the right lung lobe immediately fixed and processed for both histology (Nandedkar et al., 2008) and TEM (detailed below). Resident lung eosinophils isolated from nontreated mice ($n = 5$) as before (Percopo et al., 2017) were used as controls. Histopathological analyses confirmed the extensive deposition of collagen fibers and eosinophilic inflammatory infiltrate typical of allergic inflammation (Supplementary Figure S1).

Influenza Model

Weight-matched C57BL/6J mice ($n = 5$) were infected with 1000 TCID₅₀ pH1N1 virus, intranasally under isoflurane anesthesia as previously described (Samarasinghe et al., 2017). The A/CA/04/2009 strain (pH1N1) is a clinical IAV isolate recovered during the 2009 IAV pandemic, kindly provided by Dr. Richard Webby (SJCRRH) and propagated in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (ATCC, Manassas, VA, USA). Strains of pH1N1 were sequenced to confirm genetic integrity of hemagglutinin and neuraminidase genes and stored as single use aliquots at -80°C . The concentration of virus was determined as described (LeMessurier et al., 2020). The term "flu" is used to refer to mice that develop influenza as a consequence of infection with pH1N1. Mice were weighed daily starting before infection and euthanized by CO₂ asphyxiation at 7 days post infection. The infectious dose induced morbidity but no mortality. In the noninfected control group ($n = 5$), mice received just saline. Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed by 2 washes each with 1 ml PBS and recovered cells immediately fixed and processed for TEM, as detailed below.

Schistosomiasis Mansoni Model

Swiss Webster mice aged 70 days were injected subcutaneously with a single inoculum of cercariae of *S. mansoni* (100 cercariae/mouse), LE strain as previous work (Dias et al., 2018). Infection was confirmed by findings of parasite eggs in the rodent feces at week five of infection (Hoffman et al., 1934). Infected animals ($n = 6$) and respective uninfected controls ($n = 6$) from the same age were euthanized at 55 days of infection (acute phase) (Borojevic et al., 1981) by exsanguination (full bleed) under deep anesthesia by cardiac puncture. The anesthetic protocols included ketamine (100 mg/ml) combined with acepromazine (10 mg/ml) at a ratio of 9:1 (dose of 0.15 ml/100 g body weight) (Hawk et al., 2005). Fragments of the large intestine (from infected and noninfected controls) were immediately fixed and processed for both histology as previous work (Amaral et al., 2017) and TEM (detailed below). Histopathological analyses confirmed the development of a typical granulomatous inflammatory response around parasite eggs in the large intestine of *Schistosoma mansoni*-infected mice (Supplementary Figure S1) as previously detailed by our group (Amaral et al., 2017).

Cultures of Bone Marrow-Derived Eosinophils

Bone marrow-derived eosinophils (BMdEos) were generated as described (Dyer et al., 2008) from the tibias and femurs of female BALB/c mice. Each culture was prepared through undifferentiated cells from two animals and a total of 21 cultures were used in the present study. Cells were collected and evaluated at days 0, 4, 6, 8, 10, 12 and 14, with cell collections from three different cultures for each point for experiments by light microscopy (cytospin preparations stained with routine hematological stains), flow cytometry, and transmission electron microscopy (TEM) as described below. Cell viability was $>93\%$ as determined by the trypan blue exclusion test.

Flow Cytometry

BMdEos (1×10^6 cells/well) were incubated with fluorescently tagged antibodies in PBS with 0.1% BSA for 30 min at 4°C . After staining, the cells were washed with PBS with 0.1% BSA and fixed in 4% paraformaldehyde. Data were acquired in a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FloJo software v 7.1 (Tree Star, Ashland, OR). Positive cells were identified by comparison to the appropriately conjugated isotype control. Antibodies (all from BD Pharmingen) used included PE-conjugated rat anti-mouse Siglec-F or PE-conjugated IgG2a isotype control.

TEM

Tissue fragments (lungs and intestines) were fixed in a mixture of freshly prepared aldehydes [final concentration of 1% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde (EM grade, 50% aqueous, Electron Microscopy Sciences-EMS, Hatfield, PA)] in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, at room temperature (RT). After 2h, fragments were sliced into small pieces of 1 mm^3 and fixed in the same fixative at 4°C . Next, the fragments were washed twice (4 h each) in 0.1 M sodium phosphate buffer in 0.1 M sodium phosphate buffer at 4°C and kept in the same buffer for additional processing. Cell suspensions (samples from cultures, BALs, and resident eosinophils isolated from control lungs) were fixed in the same fixative solution as above (while still in suspension) for 1 h at RT or in 1% paraformaldehyde and 1.5% glutaraldehyde in 1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, for 1 h at RT and embedded in agar pellets for accurate handling of the eosinophils as previously described (Melo et al., 2005). All samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide in Sym-Collidine buffer, pH 7.4, for 2 h at RT. After washing with sodium maleate buffer, pH 5.2, they were stained *en bloc* in 2% uranyl acetate (EMS) in 0.05 M sodium maleate buffer, pH 6.0, for 2 h at RT and washed in the same buffer as before prior to dehydration in graded ethanol and acetone, and infiltration and embedding with a propylene oxide-Epon sequence (Eponate 12 Resin, Ted Pella, Redding, CA, USA). After polymerization at 60°C for 16 h, thin sections were obtained using a diamond knife on an ultramicrotome (Leica, Bannockburn, IL). Sections were mounted on uncoated 200-mesh copper grids (Ted Pella) before staining with lead citrate and viewed with a transmission electron

microscope (CM 10; Philips, or Tecnai G2-20-ThermoFischer Scientific/FEI 2006, Eindhoven, the Netherlands) at 80–120 KV.

TEM Quantitative Analyses

Electron micrographs showing the entire cell profile, nucleus, and intact plasma membrane were randomly taken from eosinophils during different conditions/diseases. The following aspects were evaluated and quantitated in the eosinophil cytoplasm (total $n = 204$ cells and 1720 mitochondria): 1) Mitochondrial numbers; 2) Mitochondrial size (area of individual mitochondria in μm^2); 3) Mitochondria proportion/cell section (total mitochondrial area/[cell area—nucleus area]) (Picard et al., 2013); 4) Total number of mitochondrial cristae per μm^2 of mitochondrial area; 5) Cristae morphology; 7) Cristae volume (the sum of the areas of all the cristae in a single mitochondrion divided by the mitochondrion area) (Lam et al., 2021). Cristae shapes were classified in three morphological patterns: lamellar, tubular, or mixed. Lamellar cristae were identified in thin sections as parallel linear structures resembling the format of “shelves”. The tubular pattern of cristae was identified by the presence of “small circles” arranged in the mitochondrial matrix while the presence of lamellar and tubular cristae within a single mitochondrion denoted mitochondria with “mixed” cristae. Additionally, mitochondrial interactions were investigated in the cytoplasm. We quantitated all inter-organelle interactions involving mitochondria represented by membrane contacts and the number of these interactions was expressed per cell section.

Electron Tomography

Electron tomography and 3D reconstruction were performed as previous works from our group (Melo et al., 2005; Melo et al., 2013). Eponate sections (200 nm-thickness) were collected on 100 mesh-formvar coated grids. Samples were contrasted with lead citrate and the tilt series acquired at 120 kV on a Tecnai Spirit G12 microscope (Thermo Fisher Scientific/FEI, Eindhoven, Netherlands) with an Eagle 4k x 4k camera (Thermo Fisher Scientific/FEI) using SerialEM software (Mastrorade, 2005). Images in a tilt series were collected at intervals of -65° to $+65^\circ$ in 1° intervals using a mean of 1s exposure per micrograph. Tomograms were generated using the SerialEM software. All tilted images were aligned to a common tilting axis using cross correlation, and the volumes were reconstructed by real-space weighted rear projection. A total of 7 tomograms were analyzed to characterize the mitochondrial cristae patterns and other morphological aspects. Modeling was carried out using IMOD software (Mastrorade and Held, 2017).

Statistical Analyses

One-way or 2-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test or the Student's t test was performed using GraphPad Prism version 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The normal distribution analysis (Shapiro-Wilk test) was also used to evaluate the shape descriptors. p value <0.05 was considered statistically significant. All quantitative analyses were performed using Fiji software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Multivariate logistic regression analyses were additionally performed using SPSS data analysis statistics software system version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) to estimate the probability (or risk) of a particular outcome (immature or mature eosinophils) given the values of the independent variables, that is, the effect of a group of independent variables on a binary outcome by quantifying each independent variable's unique contribution (Liou et al., 2012; Schober and Vetter, 2021). The results of these logistic regression models are presented as the odds ratio (OR). The p value <0.05 was considered statistically significant.

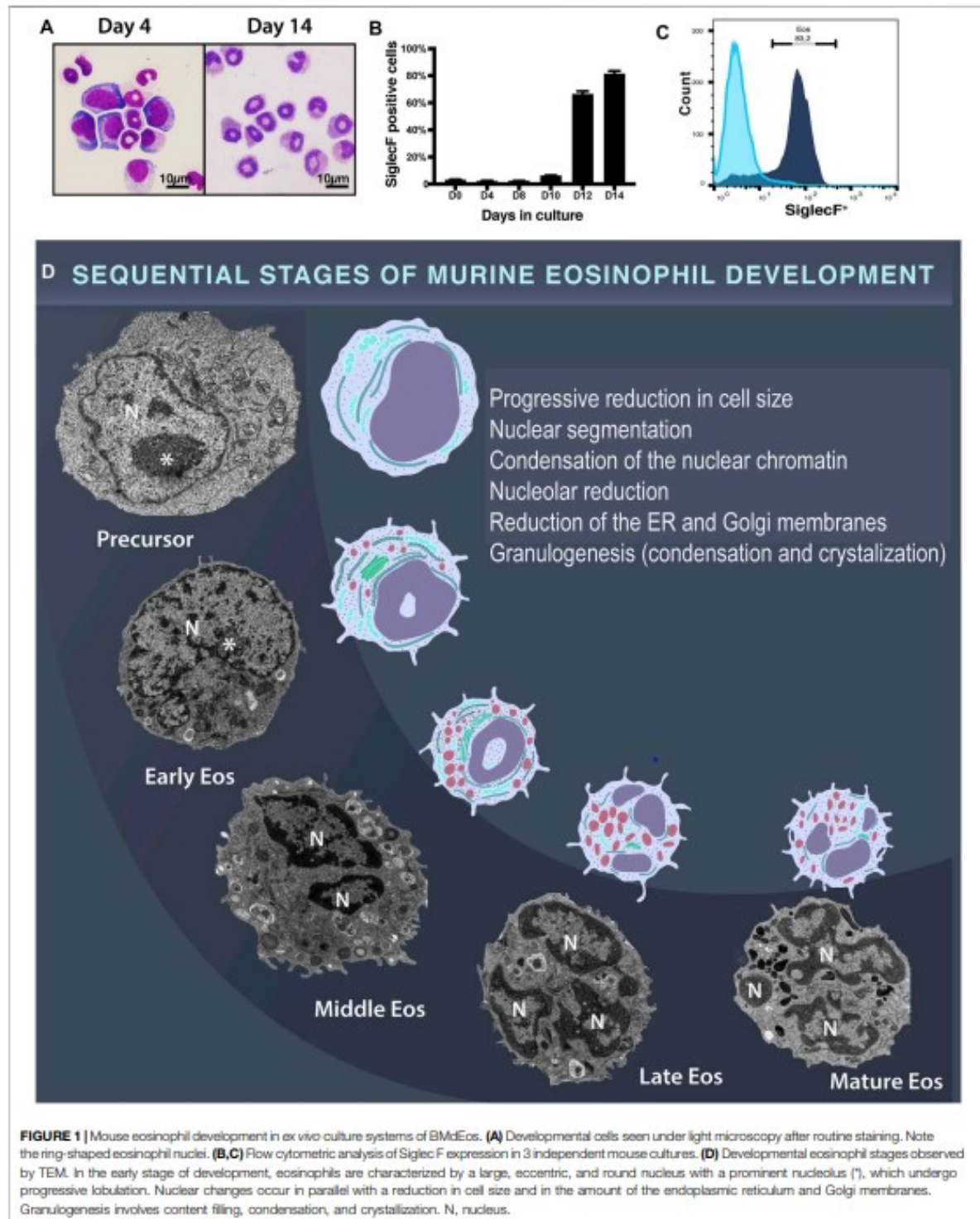
RESULTS

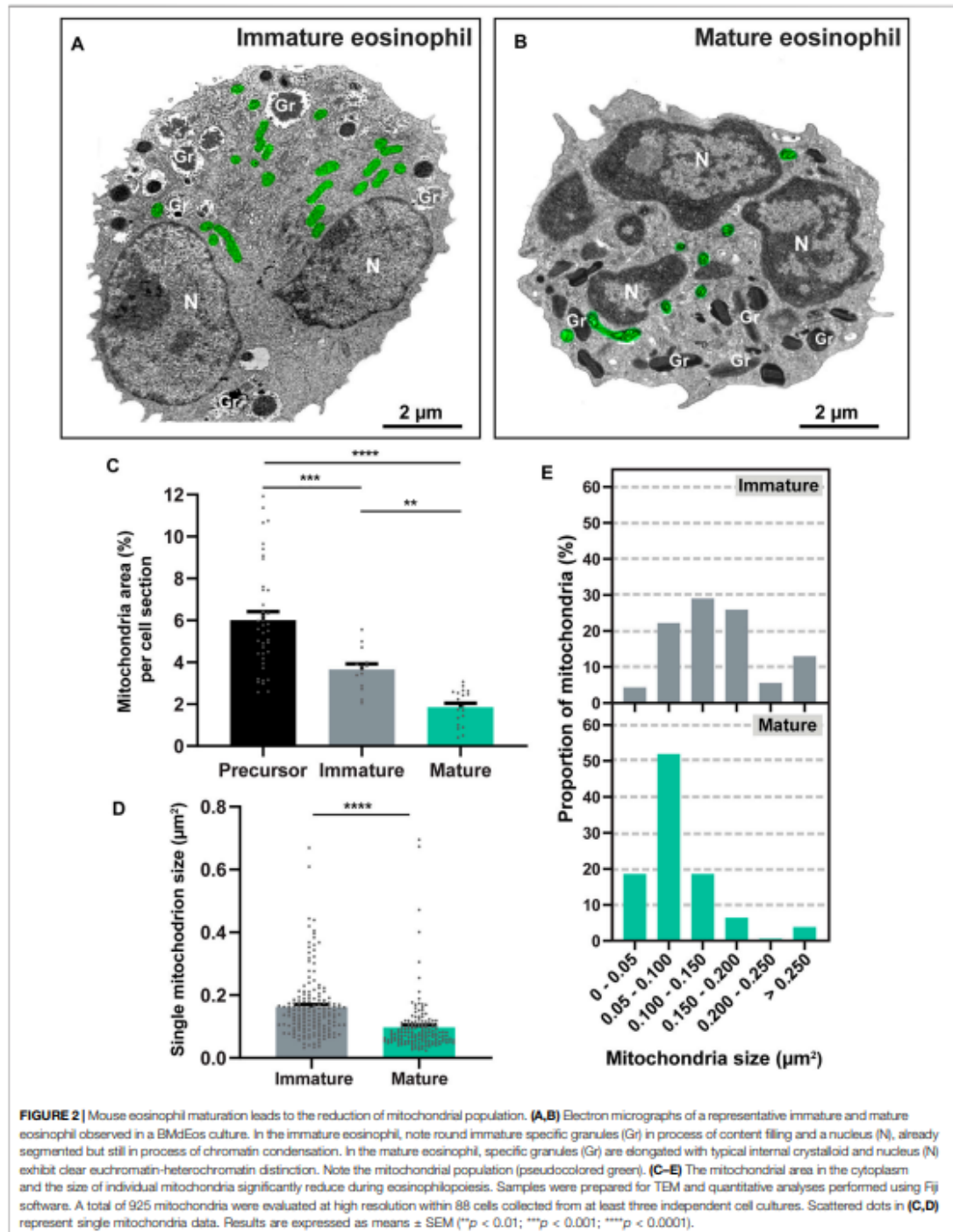
Maturation Stages of Mouse Eosinophils Revealed by TEM

First, an *ex vivo* culture system, which generates large numbers of eosinophils at high purity was established from unselected bone marrow progenitors as described (Dyer et al., 2008). Cells were evaluated at days 0, 4, 6, 8, 10, 12, and 14 by light microscopy and flow cytometry. Cytospin preparations showed cells with different nuclear morphologies including ring-shaped nuclei typical of mouse eosinophils when seen under light microscopy (Figure 1A) (Lee et al., 2012). By days 12 and 14, the proportion of cells expressing Siglec F, an eosinophil surface receptor considered a marker for this cell (Dyer et al., 2008), was 66.6 and 83.0%, respectively (Figures 1B,C).

Second, eosinophils developing in cultures as above were processed for TEM using a protocol that enables fixation of the cells while still in suspension (before any centrifugation/cell manipulation) for optimal morphological preservation (Melo et al., 2005). Considering that eosinophilopoiesis is a continuum of gradual morphologic changes, which lead to the formation of mature eosinophils, here we used the terms early, middle, late, and mature eosinophils to define the stages of eosinophil development when seen under the electron microscope (Melo et al., 2022) (Figure 1D). These stages have also been referred to as early, middle, late, and mature eosinophilic myelocytes (Dvorak et al., 1991; Melo et al., 2022).

An important feature of the eosinophil developmental morphology is related to the nucleus, which is initially round, large, and predominantly euchromatic becoming segmented and with condensed peripheral chromatin (Figure 1D). Another distinctive eosinophilopoiesis-associated event is the formation of secretory granules (granulogenesis). Indeed, the earliest ultrastructural feature that characterizes cells of the eosinophilic lineage, thus distinguishing them from a common precursor (myeloblast-like), is the presence of large cytoplasmic granules (Scott and Horn, 1970). During maturation, these granules, termed specific or secretory granules, both in humans and rodents, undergo condensation and crystallization [reviewed in (Melo and Weller, 2018)]. Thus, based on previous observations in humans (Melo and Weller, 2018) and current study in mice, eosinophil granulogenesis involves the initial formation of a population of coreless granules (immature specific granules) that progresses to mature cored granules





(specific granules). The presence of these cored granules containing a typical electron-dense crystalloid in the cytoplasm indicates a late stage of eosinophil development, which evolves to a completely mature eosinophil in which these granules predominate (Figure 1D).

By correlating the ultrastructural aspects of the cytoplasmic secretory granules and nucleus, we followed the development of mouse eosinophils in cultures, which was also accompanied by a reduction of the cell size (Figure 1D). From undifferentiated precursor to mature eosinophil, there was a reduction of 66.5% of the eosinophil size (cell areas in μm^2 of 64.6 ± 3.8 , 43.9 ± 2.7 and 28.2 ± 2.1 for precursor (myeloblast-like), immature, and mature eosinophils, respectively, n = total of 88 cells, mean $\pm$ SEM).

Eosinophil Differentiation Leads to a Reduction of the Mitochondrial Population

Having established the maturational stages of mouse eosinophils (Figure 1D), we next focused on the study of the mitochondrial population at high resolution within the cytoplasm of these cells. Eosinophils exhibiting an early and middle stage of development, that is, with most of their granules seen as coreless granules, were considered with a profile predominantly immature while eosinophils containing at least 60% of their total granule population as cored granules (late and mature stages of development) were deemed as having a profile predominantly mature (Melo et al., 2022). Thus, several morphological aspects of the mitochondrial population were evaluated and compared between these two groups of immature and mature eosinophils (Figures 2A,B).

First, we questioned if the numbers of mitochondria would vary during the process of eosinophil maturation. Mitochondria were then quantitated by TEM in precursor cells, immature and mature eosinophils collected from cultures on different days of establishment as above. By evaluating a total of 88 electron micrographs of eosinophils showing the entire cell profile and nucleus and a total of 925 mitochondria (n = 608 from precursor cells; n = 166 from immature eosinophils; and n = 151 from mature eosinophils), we found that the range of mitochondria numbers per cell section was 5–32, 4–26, and 2–20 in precursor cells, immature, and mature eosinophils, respectively. However, because mitochondria can display different sizes varying from round to very elongated morphology, we consider that the evaluation of the area occupied by these organelles in the eosinophil cytoplasm would be a more accurate parameter for mitochondria quantification than simply enumerating these organelles. Thus, by performing imaging analyses, the mitochondrial area (μm^2) was delimited and measured in relation to the cytoplasmic area in each eosinophil section (Figure 2C). Quantitative TEM showed that eosinophilopoiesis led to a reduction of 70% in the mitochondrial area (from precursor to mature cells (precursor: $6.01 \pm 0.4\%$, n = 608 mitochondria evaluated within 40 cells versus mature: $1.80 \pm 0.19\%$, n = 151 mitochondria evaluated within 20 cells; mean $\pm$ SEM, p < 0.0001) (Figures 2A–C). When eosinophils with immature and mature profiles were compared, we found that maturation led to a reduction of ~50% in the mitochondrial area

(immature: 3.65 ± 0.26 , n = 166 mitochondria evaluated within 28 cells versus mature: $1.80 \pm 0.19\%$, n = 151 mitochondria evaluated within 20 cells), mean $\pm$ SEM; p < 0.01) (Figures 2A–C).

We also analyzed the range of mitochondrial sizes at single level (area of individual mitochondria in thin sections) (Figures 2D,E). In immature cells, the mean size of a mitochondrion was $0.162 \pm 0.007 \mu\text{m}^2$ (mean $\pm$ SEM, n = 166 mitochondria), while mature cells had a mean size of $0.098 \pm 0.007 \mu\text{m}^2$ (mean $\pm$ SEM, n = 151 mitochondria). As expected, a diversity of mitochondrial sizes was obtained. However, this range was much higher in immature [14 – 886 nm^2] (n = 166 mitochondria) compared to mature [0.019 – $0.380 \mu\text{m}^2$] (n = 151 mitochondria); p < 0.0001. Interestingly, while most mitochondria (~65%) in immature eosinophils had sizes higher than $0.100 \mu\text{m}^2$, mature eosinophils exhibited ~70% of their mitochondrial population with sizes below $0.100 \mu\text{m}^2$ (Figure 2E).

Mitochondrial Dynamics During Eosinophilopoiesis

Mitochondria are organelles with a high level of plasticity, able to undergo morphological changes and interact with other organelles consonant with the cell needs (Pernas and Scorrano, 2016). By examining a vast collection of mitochondria at high resolution within differentiating mouse eosinophils, we identified a spectrum of mitochondrial ultrastructural changes and mitochondria-associated events.

First, TEM revealed that mitophagy, the selective degradation of mitochondria by autophagy (Wang and Klionsky, 2011), was a consistent event during eosinophilopoiesis. Phagophore-like membranes, cup-shaped membranous structures, and autophagosomes, double-membrane-bound vacuoles, both canonical ultrastructural evidence for autophagy (Jung et al., 2019) were seen enclosing single and/or grouped mitochondria (Figures 3A–E and Supplementary Figure S2). While 15% of immature eosinophils showed ultrastructural evidence of mitophagy with 1–3 events indicative of this process per cell section (Figures 3A–E), eosinophils with a mature profile did not exhibit apparent mitophagy in the cytoplasm. Remarkably, application of electron tomography captured in 3D the occurrence of mitochondrial vesiculation, with mitochondrial-derived vesicles budding off the mitochondrial outer membrane (Figures 3F–H), a morphological event that can precedes mitophagy (McLelland et al., 2014; Sugiura et al., 2014). Thus, our findings identify different ultrastructural events of mitophagy, a mechanism that is likely operating in the reduction of the mitochondrial population during eosinophil development.

Second, we identified different modes of mitochondrial interactions (inter-organelle membrane contacts) in the cytoplasm. In addition to the recognized mitochondria-ER (Figures 4A–C) and mitochondrion-mitochondrion association as seen here by electron tomography (Figures 4D–F), a remarkable and unexpected interaction of mitochondria with secretory granules was observed by both conventional TEM (Figures 4G–I) and electron tomography (Figures 4J–L). Interestingly, this granule-mitochondrion

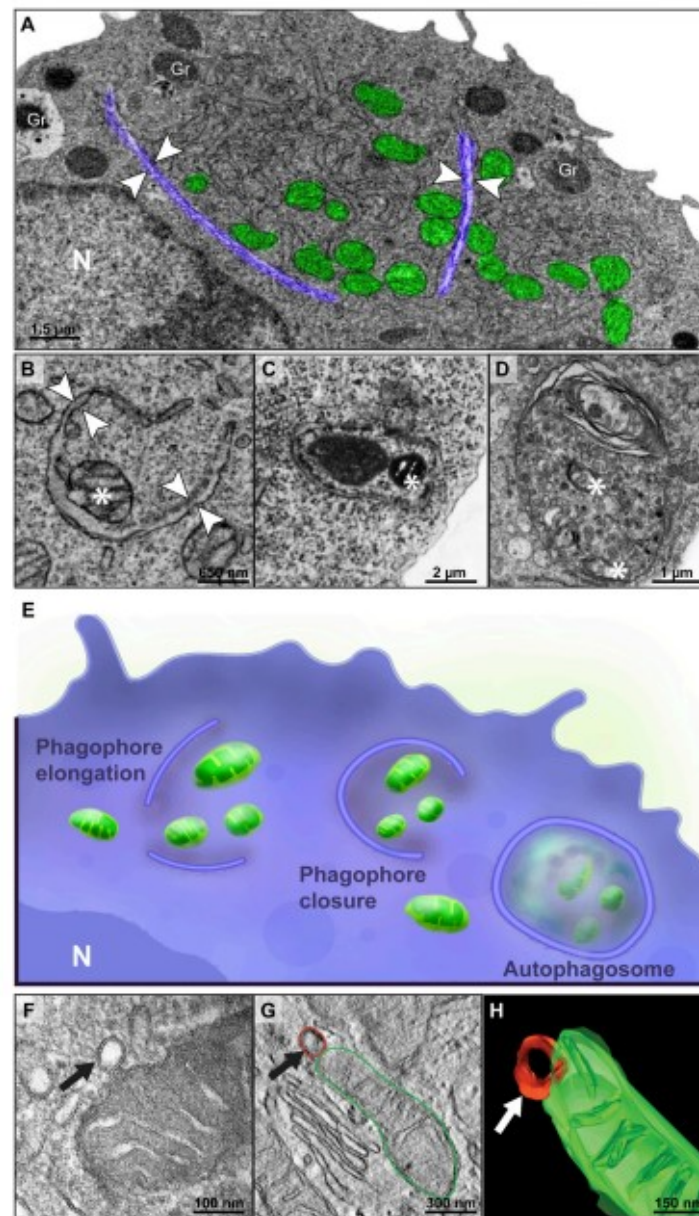
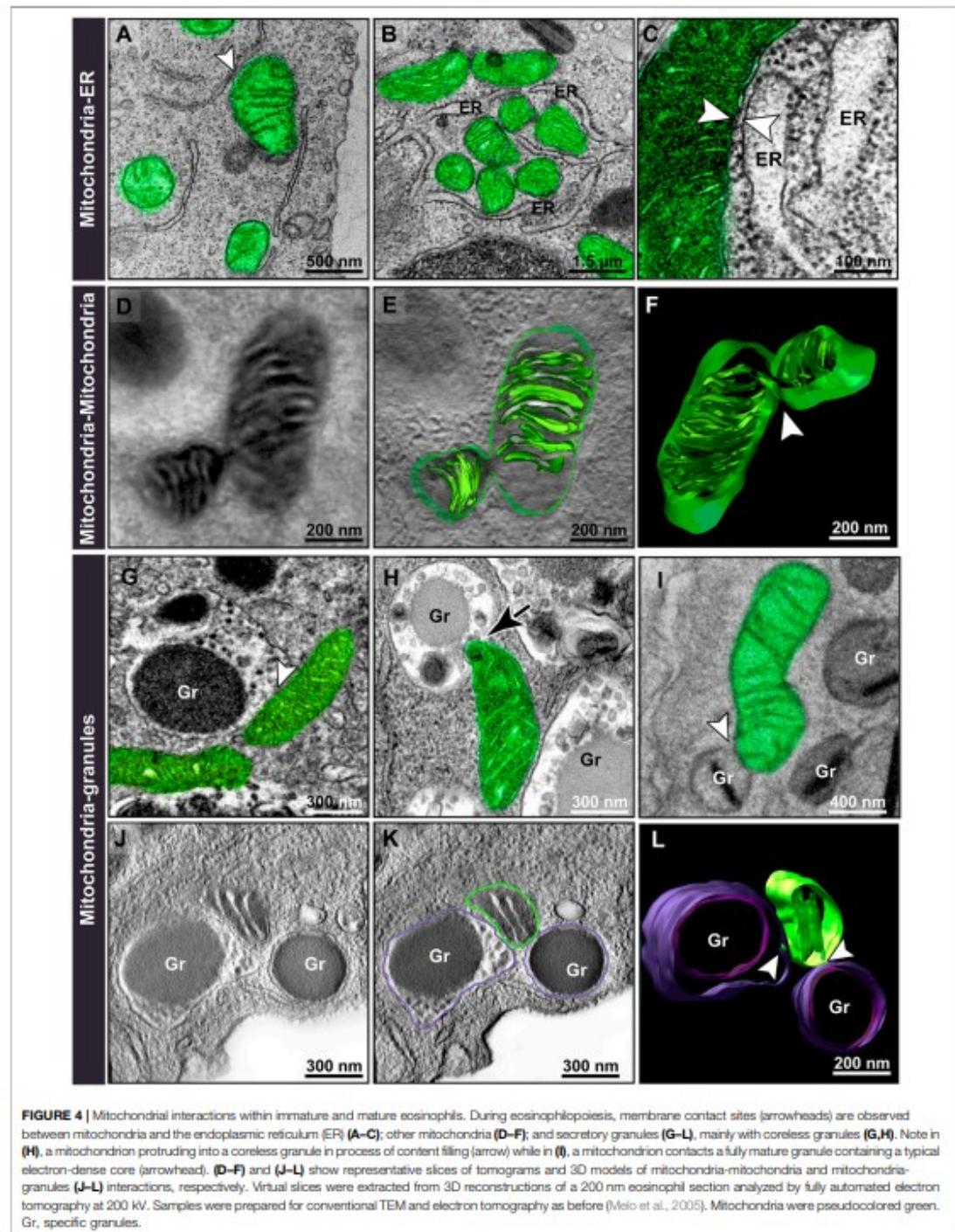
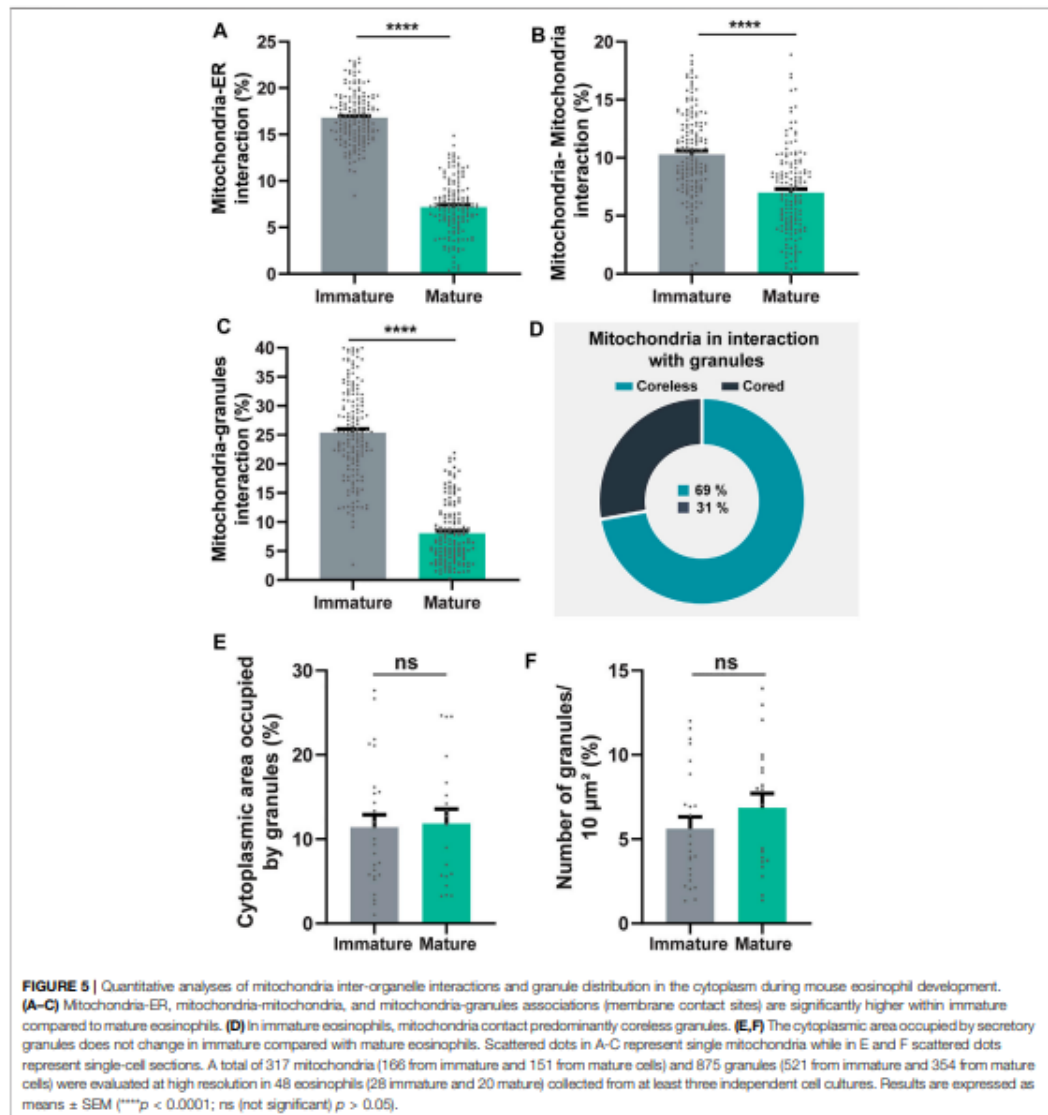


FIGURE 3 | Mitophagy is a consistent process within immature eosinophils. **(A–D)** Mitophagy events represented by the formation of phagophore-like membranes (arrowheads) in different stages of extension enclosing single or groups of mitochondria and double-membrane vacuoles containing luminal mitochondria (*) **(C,D)** were observed by TEM. In **(A)**, note that the phagophore membranes (colored in purple) are segregating a portion of the cytoplasm containing mitochondria and ER cisternae. In **(E)**, an illustration shows the multi-step process of mitophagy. **(F–H)** Electron tomographic analyses captured a mitochondrial-derived vesicle (arrow) being formed from the outer membrane. Cells were prepared for conventional TEM and electron tomography as before (Melo et al., 2005). Gr, secretory granules; N, nucleus.





association occasionally was seen as mitochondrial protrusions into the granules (Figure 4H) and not merely as contact sites.

Quantitative TEM evaluating the number of mitochondrial interaction events in each eosinophil section showed that all of the three types of mitochondrial contacts were significantly higher within immature eosinophils compared to mature ones (Mitochondria-ER: immature = $16.80 \pm 0.21\%$; mature = $7.18 \pm 0.24\%$; Mitochondria-mitochondria: immature = $10.28 \pm 0.30\%$;

mature = $6.99 \pm 0.32\%$; Mitochondria-granule: immature = $25.38 \pm 0.62\%$; mature = $8.04 \pm 0.42\%$; n (mitochondria) = 166 for immature and 151 for mature eosinophils; $p < 0.0001$ for all types of interaction) (Figures 5A–C). Remarkably, by evaluating the total number of mitochondria in physical contact with cytoplasmic granules in immature eosinophils, we found that 69% of these interactions were established with coreless granules in process of content filling while 31% were in contact

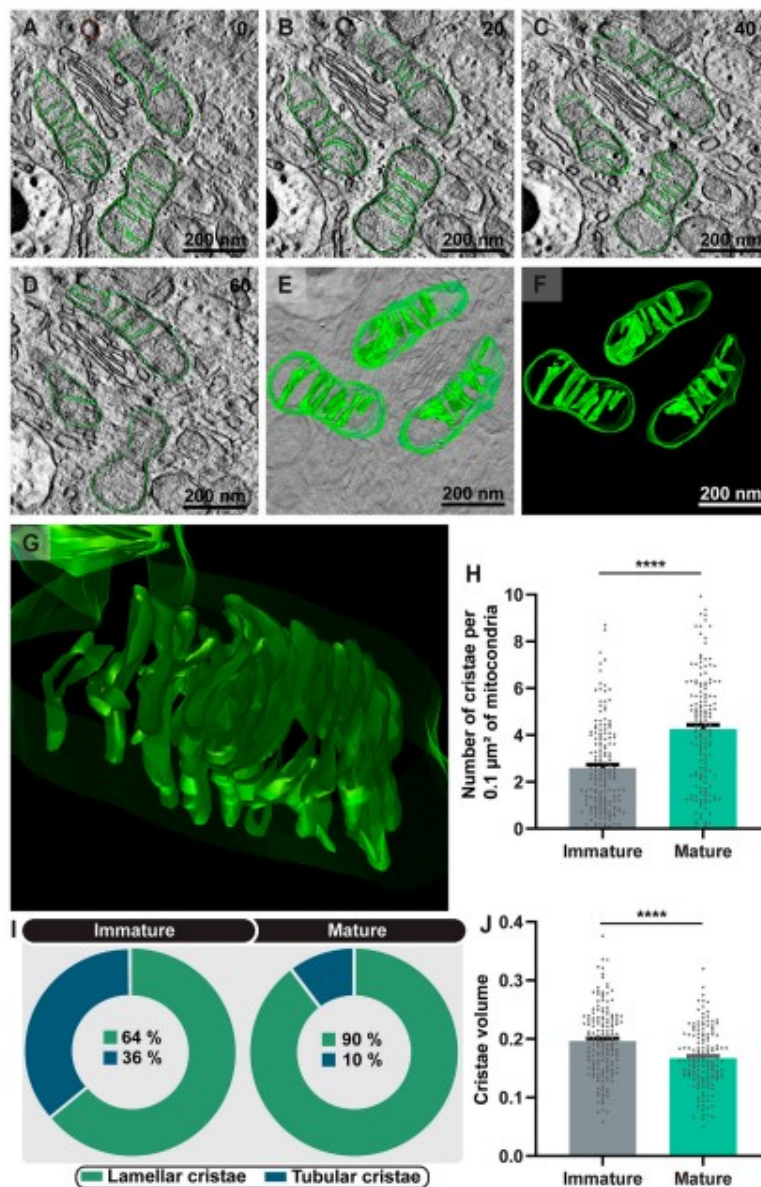


FIGURE 6 | Eosinophilopoiesis leads to increased formation of mitochondrial cristae and cristae remodeling. (A–G) Representative 4 nm-digital slices of a tomogram showing mitochondria with lamellar cristae, the most common shape of cristae found within developing mouse eosinophils. Mitochondria boundaries and internal membranes in consecutive tomogram slices were manually contoured in green and computer-based 3D models were generated (F). In (G), the aspect of lamellar cristae is shown in higher magnification. Virtual slices were extracted from 3D reconstructions of a 200 nm eosinophil section analyzed by fully automated electron tomography at 200 kV. The numbers on the upper right corner indicate the slice number through the tomographic volume. Both the total number of cristae (H) and the (Continued)

FIGURE 6 | lamellar type (I) significantly increased in concert with maturation. (J) The cristae volume was reduced in mature eosinophils. Samples were prepared for TEM and electron tomography as before (Melo et al., 2005). Quantitative analyses were performed using Fiji software. Scattered dots represent $0.1 \mu\text{m}^2$ of the mitochondrial area in (H) and single mitochondria data in (J). A total of 317 mitochondria (166 from immature and 151 from mature) were evaluated at high resolution within 48 eosinophils (28 immature and 20 mature) collected from at least three independent cell cultures. Results are expressed as means $\pm$ SEM. (**** $p < 0.0001$).

with cored granules (Figure 4I, Figure 5D). On the other hand, the distribution of these two types of granules in the cytoplasm did not vary (Figures 5E,F).

Because this mitochondria-granules interaction particularly drew our attention, we performed multivariate logistic regression analyses to evaluate the proximity of mitochondria with other 7 cell compartments (plasma membrane, nucleus, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, mitochondria, immature coreless granules, and mature cored granules) with independent variables being used to determine the influence of these multiple factors at the same time. Our data confirmed that a greater number of mitochondria in close proximity to coreless granules (OR: 1.030, $p = 0.035$) or other mitochondria (OR: 1.014, $p = 0.021$) is associated with an increased chance of a sample being of immature eosinophils while a greater number of the mitochondria in close proximity to cored granules (OR: 0.892, $p = 0.002$) is associated with an increased chance of the sample being of mature eosinophils ($n = 503$ mitochondria from immature and 166 from mature eosinophils) with a pseudo R^2 (Nagelkerke) of 0.77 and a predictive accuracy of 91.2%. Altogether, our data point out that the mitochondrion-granule interaction is not a random phenomenon.

Third, we asked if the mitochondrial cristae remodeling would be involved in the process of eosinophil differentiation. The ultrastructural morphology of the mitochondrial cristae was then analyzed in terms of numbers, morphology, and volume. Two patterns of mitochondrial cristae were found: lamellar and tubular, with mitochondria exhibiting predominantly lamellar cristae in both immature and mature eosinophils as shown by both conventional and electron tomography (Figures 6A–G). TEM quantitative analyses showed that the total number of mitochondrial cristae significantly increased in parallel to the eosinophil development (immature: 2.60 ± 0.14 versus mature: 4.25 ± 0.19 (mean $\pm$ SEM); n (mitochondria) = 166 for immature and 151 for mature eosinophils; $p < 0.0001$) (Figure 6H). Moreover, the number of mitochondria exhibiting lamellar cristae also increased with the process of maturation, that is, as the eosinophil matures cristae reshapes to the lamellar morphology (Figure 6I). In contrast, the cristae volume was reduced in mature eosinophils (immature: 0.196 ± 0.005 versus mature: 0.166 ± 0.004 (mean $\pm$ SEM); n (mitochondria) = 166 for immature and 151 for mature eosinophils; $p < 0.0001$) (Figure 6J).

Mitochondrial Dynamics During Inflammatory Diseases

Next, we wondered if the mitochondrial dynamics would change ultrastructurally in mature eosinophils participating in inflammatory diseases. We then evaluated the mitochondrial ultrastructure in well-established mouse models of allergic

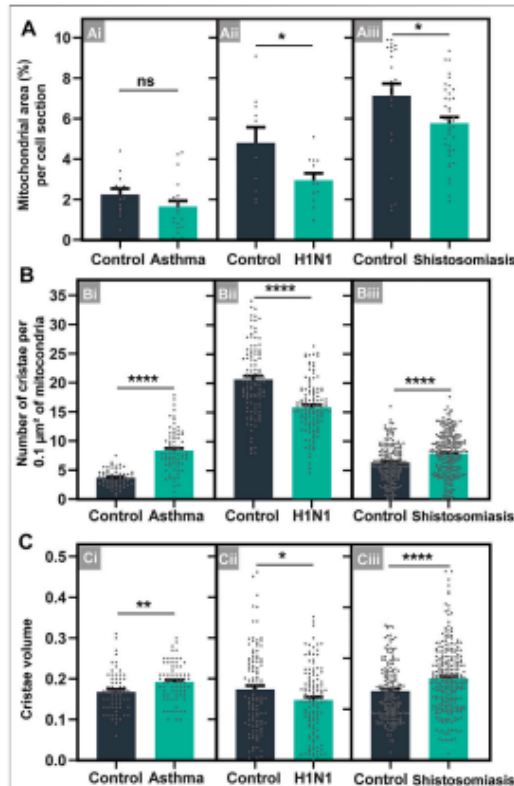


FIGURE 7 | Inflammatory diseases induce consistent mitochondrial cristae remodeling within infiltrating tissue eosinophils in mice. (A) The total mitochondrial area in the eosinophil cytoplasm did not change in asthma (Ai) or is reduced in H1N1 IAV infection (Aii) and schistosomiasis mansoni (Aiii), in response to the inflammatory diseases. (B,C) The total number (B) and volume (C) of cristae is increased in both asthma (Bi and Ci) and schistosomiasis (Biii and Ciii), but not in the H1N1 IAV infection (Bii and Cii). Samples were prepared for TEM and quantitative analyses performed using Fiji software. Scattered dots represent single-cell data in (A); $0.1 \mu\text{m}^2$ of the mitochondrial area in (B); and single mitochondria data in (C). A total of 795 mitochondria were evaluated at high resolution within 116 cells collected from at least five independent experiments for each condition. Cells were prepared for TEM. Results are expressed as means $\pm$ SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; ns (not significant) $p > 0.05$).

inflammation/asthma (Serra et al., 2012) and IAV (Samarasinghe et al., 2017; LeMessurier et al., 2020) and parasite (schistosomiasis mansoni) (Amaral et al., 2017; Dias

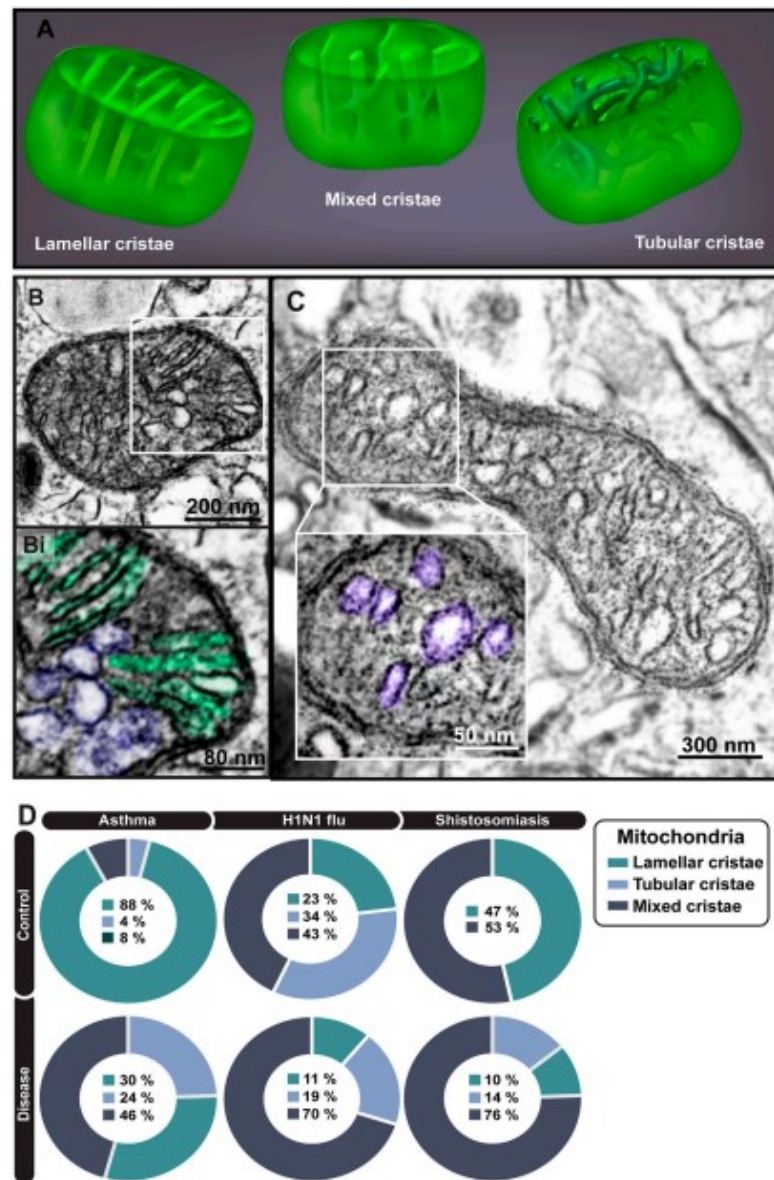


FIGURE 8 | Ultrastructural aspects of mitochondrial cristae within mouse eosinophils. **(A)** Illustration depicting the three types of cristae—lamellar, tubular, and mixed. In **(B)**, a representative mitochondrion with both lamellar (highlighted in green in **B**) and tubular (highlighted in purple in **B**) cristae while **(C)** shows a mitochondrion with predominantly tubular cristae (colored in purple in **C**). **(D)** Cristae remodeling is observed in all diseases in inflammatory eosinophils compared to resident ones. A total of 795 mitochondria were evaluated at high resolution within 116 cells collected from at least five independent experiments for each condition. Cells were prepared for TEM.

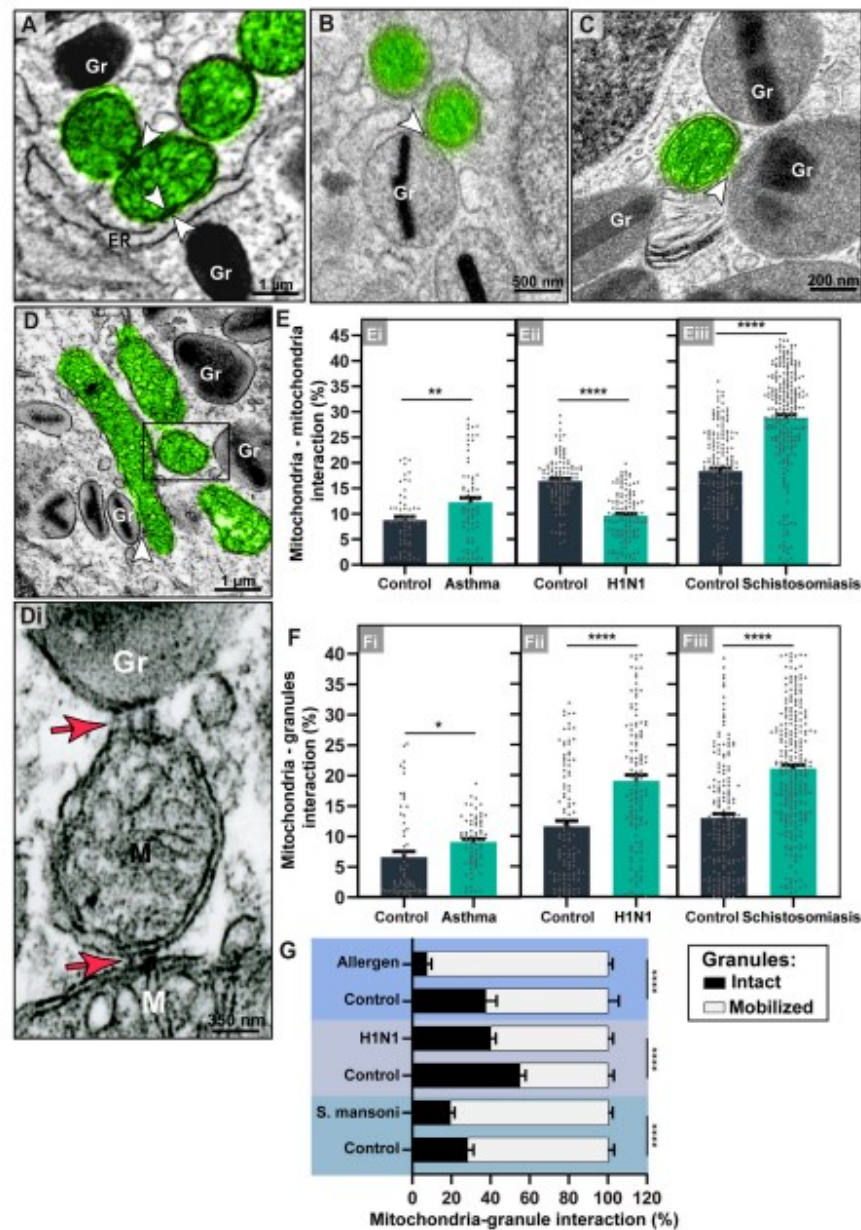


FIGURE 9 | Mitochondrial inter-organelle contact sites within tissue mouse eosinophils. (A–D) Representative electron micrographs showing mitochondrial interactions (arrowheads and boxed area) with the ER, other mitochondria, or secretory granules (Gr) within inflammatory eosinophils recruited by schistosomiasis mansoni (A and B, large intestine), asthma (C, lung), and H1N1 IAV infection (D, BAL). The boxed area in (D) is shown in (Di). Note the presence of tethers (red arrows) at the interface mitochondrion-mitochondrion (M) and mitochondrion-secretory granule (Gr). (E–F) Mitochondria-mitochondria contact sites increased within eosinophils in asthma and schistosomiasis but not in response to H1N1 IAV infection. (F–G) All inflammatory diseases led to a significant increase of mitochondria-granule interaction. (Continued)

FIGURE 9 | granules interactions, notably with mobilized granules as shown in (G). Mitochondria were colored in green in (A–D). Scattered dots in (E,F) represent single mitochondria data. A total of 795 mitochondria were evaluated at high resolution within 116 cells collected from at least five independent experiments for each condition. Samples were prepared for TEM. Results are expressed as means $\pm$ SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$).

et al., 2018) infections, all conditions characterized by eosinophil recruitment and activation. Mitochondria were studied *in situ* in eosinophils from the lung parenchyma (allergic inflammation), large intestine (schistosomiasis mansoni), and in BALs (IAV infection) after cell fixation and processing for TEM following the same protocols that we have been using to conduct pathological analyses of human eosinophils in tissues and cell suspensions, which enable optimal morphology (Melo et al., 2022).

Compared to control eosinophils from the same organ/tissue/condition, the cytoplasmic area occupied by mitochondria within eosinophils did not change in allergic inflammation and it was reduced in response to both viral and parasitic infections (Figures 7Ai–Aiii; See also Supplementary Figure S3). Means $\pm$ SEM (n = cell sections) for cytoplasmic area occupied by mitochondria are: 1) asthma: 2.24 ± 0.28 (control, $n = 13$) versus 1.64 ± 0.28 (treated, $n = 20$); $p = 0.16$; 2) schistosomiasis: 7.12 ± 0.61 (control, $n = 22$) versus 5.76 ± 0.3 (infected, $n = 39$); $p < 0.05$; 3) H1N1 IAV infection: 4.79 ± 0.77 (control, $n = 10$) versus 2.94 ± 0.34 (infected, $n = 12$); $p < 0.05$.

On the other hand, our imaging analyses at high resolution captured a significant increase in the numbers (Figures 7Bi–Biii) and volume (Figures 7Ci–Ciii) of mitochondrial cristae in response to allergic inflammation and schistosomiasis, but not to the H1N1 IAV infection, which lead to the reduction of both cristae numbers and volume. Means $\pm$ SEM (n = number of mitochondria) for cristae numbers are: 1) asthma: 3.62 ± 0.36 (control, $n = 62$) and 7.82 ± 1.02 (treated, $n = 72$); $p < 0.0001$; 2) schistosomiasis: 6.36 ± 0.37 (control, $n = 175$) and 7.5 ± 0.31 (infected, $n = 257$); $p < 0.0001$; 3) H1N1 IAV infection: 20.36 ± 1.46 (control, $n = 110$) and 15.32 ± 1.17 (infected, $n = 119$); $p < 0.0001$. Means $\pm$ SEM (n = number of mitochondria) for cristae volume are: 1) asthma: 0.17 ± 0.006 (control, $n = 62$) and 0.19 ± 0.005 (treated, $n = 72$); $p = 0.006$; 2) schistosomiasis: 0.14 ± 0.004 (control, $n = 175$) and 0.16 ± 0.004 (infected, $n = 257$); $p < 0.001$; 3) H1N1 IAV infection: 0.17 ± 0.009 (control, $n = 110$) and 0.14 ± 0.007 (infected, $n = 119$); $p = 0.032$.

When in the tissue microenvironment, mitochondria within eosinophils formed mixed cristae, a morphological pattern characterized by tubular and lamellar cristae within the same mitochondrion (Figures 8A–C), not observed in developing eosinophils. Quantitative TEM showed that, in general, eosinophils participating in inflammatory responses reduced the numbers of lamellar cristae and increased the numbers of mixed cristae in their population of mitochondria (Figure 8D). However, the proportions of mitochondria containing only lamellar or tubular, or mixed cristae changed depending on the cell microenvironment/disease (Figure 8D).

Finally, we sought for mitochondrial interactions within inflammatory eosinophils (Figures 9A–D). By enumerating

inter-organelle membrane contacts, we found that while mitochondria-ER contacts as seen in Figure 9A were not significantly increased during inflammatory responses in all diseases ($p > 0.05$), mitochondria-mitochondria interactions increased in asthma (Means $\pm$ SEM (n = mitochondria) of $8.74 \pm 0.69\%$ (control, $n = 62$) versus $12.22 \pm 0.93\%$ (treated, $n = 72$); $p = 0.004$; (Figure 9Ei) and schistosomiasis mansoni (means $\pm$ SEM (n = mitochondria) of $18.44 \pm 0.61\%$ (control, $n = 172$) versus 28.87 ± 0.62 (infected, $n = 257$); $p < 0.0001$); (Figure 9Eii); and reduced in the H1N1 IAV infection (means $\pm$ SEM (n = mitochondria) of $16.40 \pm 0.48\%$ (control, $n = 110$) versus $9.60 \pm 0.43\%$ (infected, $n = 119$); $p < 0.0001$ (Figure 9Eii).

Remarkably, mitochondria contact sites with secretory granules significantly increased in all infections (Figure 9F). The means $\pm$ SEM (n = mitochondria) are: 1) Asthma model ($6.62 \pm 0.93\%$ (control, $n = 62$) versus $9.11 \pm 0.49\%$ (treated, $n = 72$); $p = 0.01$); 2) H1N1 IAV model ($11.58 \pm 0.89\%$ (control, $n = 110$) versus $19.04 \pm 0.96\%$ (infected, $n = 119$); $p < 0.0001$); 3) schistosomiasis model ($12.97 \pm 0.71\%$ (control, $n = 172$) versus $21.10 \pm 0.60\%$ (infected, $n = 257$); $p < 0.0001$). These mitochondria-granule associations involved not only membrane contacts, frequently seen as areas with increased electron density, but also tethers (narrow “projections” from the mitochondrial outer membrane), as previously described (Csordás et al., 2006) (Figures 9D,Di). These links were also shown at the interface mitochondria-mitochondria (Figure 9Di).

To get more insights into this novel identified ability of eosinophil mitochondria to interact with granules, we then wondered if these granules exhibited signs of mobilization, that is, signs indicative that their contents were in process of release. By our experience, the specific granules of mouse eosinophils show a more elliptical/elongated morphology and are less prone to undergo swelling than specific granules of human eosinophils (Melo et al., 2022). The occurrence of this event, in addition to matrix coarsening and content disarrangement, in the absence of granule fusions, is an important sign that the granules are being responsive to the tissue microenvironment with mobilization of their contents through piecemeal degranulation (Shamri et al., 2012; Dias et al., 2018; Melo et al., 2022). As expected, infiltrating inflammatory eosinophils had higher rate of mobilized secretory granules compared to control eosinophils (Supplementary Figure S4). We found that the mitochondria-granule interactions were significantly increased with mobilized granules (Figure 9G) and that such interaction does not seem to be occurring as a result of the granule distribution in the cytoplasm (Supplementary Figure S4).

Altogether, our results show the mitochondrial population of mouse eosinophils is influenced by the surrounding tissue

microenvironment and can respond to inflammatory conditions with cristae remodeling and inter-organellar contacts.

DISCUSSION

TEM is the technique of choice to visualize in detail the mitochondria architecture including their size, cristae shapes, contacts with other organelles, and morphological changes in the cell cytoplasm during different conditions [reviewed in (Duranova et al., 2020; Glancy, 2020)]. Here, we provide a systematic study of the mitochondrial ultrastructure in mouse eosinophils developing in cultures as well as recruited by inflammatory diseases. In the present work, we found that 1) the mitochondrial population significantly decreases during eosinophil differentiation and autophagy is likely playing a role in such reduction; 2) as the cell matures, mitochondrial cristae increase in number and reshapes to lamellar morphology while their volume is reduced by the end of maturation; 3) inflammation does not affect (asthma) or induces reduction (H1N1 IAV and parasitic infections) of the mitochondrial mass while cristae reshaping is a consistent event in all inflammatory conditions; 4) cristae numbers and volume within individual mitochondria can increase or decrease in response to inflammatory diseases depending on the microenvironment; and 5) mitochondria interact with other organelles, notably with secretory granules during both eosinophil differentiation and inflammation-induced cell activation.

In general, mature cells of the immune system, including eosinophils (Peachman et al., 2001), are deemed to have few numbers of mitochondria in the cytoplasm (Campello and Scorrano, 2010). Here, we show for the first time that the process of eosinophilopoiesis impacts not only the entire mitochondrial population but also the size of single mitochondria (Figure 2) and that mitophagy is likely playing a role in mitochondrial clearance in immature cells (Figure 3). Differentiation-induced mitophagy has been best demonstrated during the development of red blood cells and, in this case, it is not considered a mechanism involved in mitochondrial quality control, but rather a programmed mechanism operating to remove the mitochondrial population [reviewed in (Mortensen et al., 2010)]. A similar mechanism might be operating in eosinophils and potentially in other leukocytes, but while mitochondria are completely removed from erythrocytes, a population of mitochondria remains in eosinophils. As captured by our high-resolution analyses, this smaller mitochondrial population within mature eosinophils has increased numbers of cristae and more cristae with lamellar morphology than mitochondria from immature eosinophils, thus denoting the occurrence of a clear cristae remodeling during the process of eosinophil differentiation.

Mitochondrial cristae are crucial for mitochondria. These specialized compartments of the mitochondrial internal membrane are closely related to the mitochondria respiratory performance because specific chemical reactions and different complexes of proteins are assembled in their extent. It is

recognized that the shape, number, volume, and dimensions of the mitochondrial cristae are directly correlated with metabolic adaptation [reviewed in (Cogliati et al., 2016; Joubert and Puff, 2021)]. Thus, the finely balanced network of signaling pathways involved in the eosinophil development (from multipotent progenitors to terminally differentiated cells), which encompasses important cytokines such as IL-5 (Maltby et al., 2013) might be also modulating the population of mitochondria in a “preparation” for a different metabolic situation as circulating and mucosal resident cells. By the end of eosinophil development, there is a reduction in the cristae volume, which may indicate low metabolic activity at this stage while once in the tissue microenvironment, the volume increases or decreases depending on the disease condition. In fact, a study conducted with human peripheral blood eosinophils indicates that these cells are “metabolically flexible” with high adaptability to distinct demands of energy (Porter et al., 2018), which is in accord with our ultrastructural data. However, it is important to highlight that eosinophil bioenergetics, in both humans and mice, is still poorly understood.

The life cycle of the eosinophil is divided into bone marrow, blood, and tissue phases. Our ultrastructural findings revealed that once eosinophils are infiltrated in tissue inflammatory sites their mass of mitochondria did not change (asthma) (Figure 7Ai) or can be reduced (both infectious diseases) (Figures 7Aii,Aiii) while their cristae undergo remodeling (Figure 8). All inflammatory diseases led to changes in the cristae shape. Overall, in response to the inflammatory milieu, the numbers of lamellar cristae decreased with a parallel increase of mixed cristae, a morphological pattern characterized by both lamellar and tubular cristae, observed here just in mitochondria from tissue eosinophils (Figure 8). However, the proportions of mitochondria with lamellar, tubular, and mixed cristae vary depending on the microenvironment, thus, indicating that the mitochondria dynamics is responsive to the surrounding milieu. Our data are in accord with a previous work showing structural changes of mitochondrial cristae associated with activated leukocytes (Buck et al., 2016). While we cannot indicate which are the signaling pathways underlying inflammation-driven cristae remodeling, our findings implicate eosinophil inflammatory responses with mitochondrial dynamics. How mitochondrial cristae reshaping within eosinophils influences its immune functions is another open question to be addressed in future studies.

The mitochondrial behavior within eosinophils recruited by the IAV infection particularly drew our attention because several pieces of evidence show that H1N1 IAV target mitochondrial-dependent mechanisms [reviewed in (Cervantes-Silva et al., 2021)]. In infected epithelial cells, IAV leads to alterations of the mitochondrial dynamics and both intensified mitochondrial fission (Yoshizumi et al., 2014) or fusion/elongation (Pila-Castellanos et al., 2021) have been associated with this infection. In eosinophils, by measuring different stages of mitochondrial respiration, it was demonstrated that eosinophil respiration is significantly reduced following IAV exposure (LeMessurier et al., 2020). Our present findings are in accord and extend these observations showing that the lower respiration is probably due to a reduction of the mitochondrial mass, cristae

numbers, and cristae volume which, as noted above are interlinked with the cell respiratory performance (Cogliati et al., 2016).

Mitochondria inter-organelle interactions as a mode to regulate cell functions have been a subject of great interest. While TEM has the limitation of relying on static observations, it enables distinguishing between contiguous membranes and accurate quantification of mitochondrial morphology and interactions (Picard et al., 2013). One of the most recognized of these mitochondrial interactions is with the ER within different cell types (Csordás et al., 2006), including epithelial cells in the context of lung diseases [reviewed in (Bruno and Anathy, 2021)] and immune cells [reviewed in (Angajala et al., 2018)]. For example, in T cells, such interaction enables metabolic reprogramming necessary for immune responses (Bantug et al., 2018). In eosinophils, mitochondria interactions are poorly understood. Here, we identified that during eosinophil differentiation events of mitochondria interconnectivity with other organelles (mitochondria-ER, mitochondria-mitochondria, and mitochondria-granules) are significantly higher in immature eosinophils compared to mature cells (Figures 4, 5) when developing in cultures.

In inflammatory tissue eosinophils, mitochondria-mitochondria interactions increase in all conditions except in the H1N1 IAV infection whereas mitochondria-ER interaction was not amplified likely because the peripheral ER in mature eosinophils is not a prominent organelle (Melo et al., 2022). While mitochondria-mitochondria interaction was an expected event since mitochondria work as a team exchanging matrix proteins and are able to fuse with each other (Liu et al., 2009), membrane contacts of mitochondria with secretory granules as well as structural links at the interface mitochondria-granules (Figure 9Di) were surprisingly detected (Figure 9). During differentiation, mitochondria contact more granules in process of filling (coreless) than mature (cored) granules. Inflammation directs mitochondria to contact more granules in process of content mobilization than intact granules (Figure 7). These findings are important because provide insights into potential mitochondrial interference/regulation with processes of eosinophil granulogenesis and secretion underlying inflammatory responses. It is clear that mitochondria have functions that go beyond cell respiration and the role of these organelles interrelated with the immune machinery is starting to emerge.

In conclusion, we identified that eosinophilopoiesis leads to a significant reduction of the mitochondrial population and that both differentiation and inflammation-induced activation interfere with the mitochondrial dynamics within mouse eosinophils. The resulting increased cristae remodeling and inter-organelle contacts, including mitochondria-secretory granules interactions, may potentially influence eosinophil immune responses. The understanding of how mitochondrial dynamics contribute to eosinophil immune functions is an open interesting field to be explored.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Animal Care and Use Committees of the following Institutions: Federal University of Rio de Janeiro, Brazil (Comissão de Ética no Uso de animais/CEUA-CCS/UFRJ 090/18); Oswaldo Cruz Foundation, Brazil (CEUA/Fiocruz-0213-4/2007; CEUA/Fiocruz 32/2012); and University of Tennessee Health Science Center (UTHSC), USA. CEUA follows the Brazilian national guidelines recommended by the National Council for Animal Experimentation-CONCEA (Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RM provided the study supervision and prepared the final version of the manuscript. KB, VK, AS, and KM performed experiments. KB performed electron tomography and prepared the illustrations. KB, CP, TS, VN, BF, IN, KM, and EO-B performed imaging analyses. KB and TS prepared the figures. All authors contributed in part to writing and editing the manuscript and approved the final version.

FUNDING

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, grants 434914/2018-5 and 309734/2018-5 to RM and 310475/2017-1 to CBM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil) to RM, and FAPERJ E26/302.534/2019 to CBM. AS is supported by the USA National Institutes of Health R01-AI125481. VN is holder of a Dimensions Sciences (DS-BRIDGES) scholarship. CP is a fellowship holder from CNPq. KM is a fellowship holder from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the UFMG Microscopy Center (Centro de Microscopia, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil) for technical support in sample preparation and image acquisition for TEM.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.836755/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Amaral, K. B., Silva, T. P., Dias, F. F., Malta, K. K., Rosa, F. M., Costa-Neto, S. F., et al. (2017). Histological Assessment of Granulomas in Natural and Experimental *Schistosoma Mansoni* Infections Using Whole Slide Imaging. *PLoS One* 12, e0184696. doi:10.1371/journal.pone.0184696
- Angajala, A., Lim, S., Phillips, J. B., Kim, J.-H., Yates, C., You, Z., et al. (2018). Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights into Immuno-Metabolism. *Front. Immunol.* 9, 1605. doi:10.3389/fimmu.2018.01605
- Bahat, A., and Gross, A. (2019). Mitochondrial Plasticity in Cell Fate Regulation. *J. Biol. Chem.* 294, 13852–13863. doi:10.1074/jbc.rev118.000828
- Bantug, G. R., Fischer, M., Grählert, J., Balmer, M. L., Unterstab, G., Develiglu, L., et al. (2018). Mitochondria-endoplasmic Reticulum Contact Sites Function as Immunometabolic Hubs that Orchestrate the Rapid Recall Response of Memory CD8⁺ T Cells. *Immunity* 48, 542–555. e546. doi:10.1016/j.immuni.2018.02.012
- Borojevic, R., Stocker, S., and Grimaud, J. A. (1981). Hepatic Eosinophil Granulocytopenia in Murine Experimental Schistosomiasis *Mansoni*. *Br. J. Exp. Pathol.* 62, 480–489.
- Bruno, S. R., and Ananth, V. (2021). Lung Epithelial Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial 3D Ultrastructure: a New Frontier in Lung Diseases. *Histochem. Cell Biol.* 155 (2), 291–300. doi:10.1007/s00418-020-01950-1
- Buck, M. D., O'Sullivan, D., Klein Geltink, R. L., Curtis, J. D., Chang, C.-H., Sanin, D. E., et al. (2016). Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell* 166, 63–76. doi:10.1016/j.cell.2016.05.035
- Campello, S., and Scorrano, L. (2010). Mitochondrial Shape Changes: Orchestrating Cell Physiology. *EMBO Rep.* 11, 678–684. doi:10.1038/embor.2010.115
- Cervantes-Silva, M. P., Cox, S. L., and Curtis, A. M. (2021). Alterations in Mitochondrial Morphology as a Key Driver of Immunity and Host Defence. *EMBO Rep.* 22, e53086.
- Chen, H., and Chan, D. C. (2017). Mitochondrial Dynamics in Regulating the Unique Phenotypes of Cancer and Stem Cells. *Cell Metab.* 26, 39–48. doi:10.1016/j.cmet.2017.05.016
- Cogliati, S., Enriquez, J. A., and Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: where beauty Meets Functionality. *Trends Biochem. Sci.* 41, 261–273. doi:10.1016/j.tibs.2016.01.001
- Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., et al. (2006). Structural and Functional Features and Significance of the Physical Linkage between ER and Mitochondria. *J. Cell Biol.* 174, 915–921. doi:10.1083/jcb.200604016
- Dias, F. F., Amaral, K. B., Malta, K. K., Silva, T. P., Rodrigues, G. S. C., Rosa, F. M., et al. (2018). 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. doi:10.3389/fimmu.2018.03019
- Duranova, H., Valkova, V., Knažicka, Z., Olexikova, L., and Vasicek, J. (2020). Mitochondria: A Worthwhile Object for Ultrastructural Qualitative Characterization and Quantification of Cells at Physiological and Pathophysiological States Using Conventional Transmission Electron Microscopy. *Acta Histochem.* 122, 151646. doi:10.1016/j.acthis.2020.151646
- Dvorak, A. M., Ackerman, S. J., and Weller, P. F. (1991). "Subcellular Morphology and Biochemistry of Eosinophils," in *Blood Cell Biochemistry. Megakaryocytes, Platelets, Macrophages, and Eosinophils*. Editor J. R. Harris (New York: Plenum Press). doi:10.1007/978-1-4757-9531-8_9
- Dyer, K. D., Moser, J. M., Czapiga, M., Siegel, S. J., Percopo, C. M., and Rosenberg, H. F. (2008). Functionally Competent Eosinophils Differentiated *Ex Vivo* in High Purity from normal Mouse Bone Marrow. *J. Immunol.* 181, 4004–4009. doi:10.4049/jimmunol.181.6.4004
- Galloway, C. A., Lee, H., and Yoon, Y. (2012). Mitochondrial Morphology: Emerging Role in Bioenergetics. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 2218–2228. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.035
- Glancy, B. (2020). Visualizing Mitochondrial Form and Function within the Cell. *Trends Mol. Med.* 26, 58–70. doi:10.1016/j.molmed.2019.09.009
- Hawk, C. T., Leary, S. L., Morris, T. H., Medicine, A. C. O. L. A., and Medicine, E. C. O. L. A. (2005). *Formulary for Laboratory Animals*. Ames, Iowa: Blackwell.
- Hoffman, W. A., Pons, J. A., and Janer, J. L. (1934). Sedimentation Concentration Method in Schistosomiasis *Mansoni*. *Puerto Rico J. Publ. Health Trop. Med.* 9, 283–289.
- Joubert, F., and Puff, N. (2021). Mitochondrial Cristae Architecture and Functions: Lessons from Minimal Model Systems. *Membranes* 11, 465. doi:10.3390/membranes11070465
- Jung, M., Choi, H., and Mun, J. Y. (2019). The Autophagy Research in Electron Microscopy. *Appl. Microsc.* 49, 11–17. doi:10.1186/s42649-019-0012-6
- Lam, J., Katti, P., Biete, M., Mungai, M., AshShareef, S., Neikirk, K., et al. (2021). A Universal Approach to Analyzing Transmission Electron Microscopy with ImageJ. *Cells* 10, 2177. doi:10.3390/cells10092177
- Lee, J. J., Jacobsen, E. A., Ochkur, S. I., McGarry, M. P., Condjella, R. M., Doyle, A. D., et al. (2012). Human versus Mouse Eosinophils: "That Which We Call an Eosinophil, by Any Other Name Would Stain as Red". *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 572–584. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.025
- LeMessurier, K. S., Rooney, R., Ghoneim, H. E., Liu, B., Li, K., Smallwood, H. S., et al. (2020). Influenza A Virus Directly Modulates Mouse Eosinophil Responses. *J. Leukoc. Biol.* 108, 151–168. doi:10.1002/jlb.4ma0320-343r
- Liou, C.-W., Chen, J.-B., Tiao, M.-M., Weng, S.-W., Huang, T.-L., Chuang, J.-H., et al. (2012). Mitochondrial DNA Coding and Control Region Variants as Genetic Risk Factors for Type 2 Diabetes. *Diabetes* 61, 2642–2651. doi:10.2337/db11-1369
- Liu, X., Weaver, D., Shirihai, O., and Hajnóczky, G. (2009). Mitochondrial 'kiss-and-run': Interplay between Mitochondrial Motility and Fusion-Fission Dynamics. *EMBO J.* 28, 3074–3089. doi:10.1038/emboj.2009.255
- Malby, S., McNagy, K. M., Ackerman, S. J., Du, J., Mori, Y., Iwasaki, H., et al. (2013). "Eosinophilopoiesis," in *Eosinophils in Health and Disease*. Editors J. J. Lee and H. F. Rosenberg (Elsevier), 73–119.
- Mastroratte, D. N. (2005). Automated Electron Microscope Tomography Using Robust Prediction of Specimen Movements. *J. Struct. Biol.* 152, 36–51. doi:10.1016/j.jsb.2005.07.007
- Mastroratte, D. N., and Held, S. R. (2017). Automated Tilt Series Alignment and Tomographic Reconstruction in IMOD. *J. Struct. Biol.* 197, 102–113. doi:10.1016/j.jsb.2016.07.011
- McLelland, G. L., Soubannier, V., Chen, C. X., McBride, H. M., and Fon, E. A. (2014). Parkin and PINK1 Function in a Vesicular Trafficking Pathway Regulating Mitochondrial Quality Control. *EMBO J.* 33, 282–295. doi:10.1002/embj.201385902
- Melo, R. C. N., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2010). Contributions of Electron Microscopy to Understand Secretion of Immune Mediators by Human Eosinophils. *Microsc. Microanal.* 16, 653–660. doi:10.1017/s1431927610093864
- Melo, R. C. N., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2022). *Eosinophil Ultrastructure. Atlas of Eosinophil Cell Biology and Pathology*. Elsevier, 1–518.
- Melo, R. C. N., Paganoti, G. F., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2013). The Internal Architecture of Leukocyte Lipid Body Organelles Captured by Three-Dimensional Electron Microscopy Tomography. *PLoS One* 8, e59578. doi:10.1371/journal.pone.0059578
- Melo, R. C. N., Perez, S. A. C., Spencer, L. A., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2005). Intragranular Vesiculotubular Compartments Are Involved in Piecemeal Degranulation by Activated Human Eosinophils. *Traffic* 6, 866–879. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00322.x
- Melo, R. C. N., Spencer, L. A., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2008). Mechanisms of Eosinophil Secretion: Large Vesiculotubular Carriers Mediate Transport and Release of Granule-Derived Cytokines and Other Proteins. *J. Leukoc. Biol.* 83, 229–236. doi:10.1189/jlb.0707503
- Melo, R. C. N., and Weller, P. F. (2018). Contemporary Understanding of the Secretory Granules in Human Eosinophils. *J. Leukoc. Biol.* 104, 85–93. doi:10.1002/jlb.3mr1217-476r
- Melo, R. C. N., and Weller, P. F. (2016). Vesicular Trafficking of Immune Mediators in Human Eosinophils Revealed by Immunoelectron Microscopy. *Exp. Cell Res.* 347, 385–390. doi:10.1016/j.yexcr.2016.08.016
- Mortensen, M., Ferguson, D. J. P., and Simon, A. K. (2010). Mitochondrial Clearance by Autophagy in Developing Erythrocytes: Clearly Important, but Just How Much So? *Cell Cycle* 9, 1901–1906. doi:10.4161/cc.9.10.11603
- Nandedkar, S. D., Feroah, T. R., Hutchins, W., Weihs, D., Konduri, K. S., Wang, J., et al. (2008). Histopathology of Experimentally Induced Asthma in a Murine Model of Sickle Cell Disease. *Blood* 112, 2529–2538. doi:10.1182/blood-2008-01-132506

- Peachman, K. K., Lyles, D. S., and Bass, D. A. (2001). Mitochondria in Eosinophils: Functional Role in Apoptosis but Not Respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 1717–1722. doi:10.1073/pnas.98.4.1717
- Percopo, C. M., Brenner, T. A., Ma, M., Kraemer, L. S., Hakeem, R. M. A., Lee, J. J., et al. (2017). SiglecF + Gr1 Hi Eosinophils Are a Distinct Subpopulation within the Lungs of Allergen-Challenged Mice. *J. Leukoc. Biol.* 101, 321–328. doi:10.1189/jlb.3a0416-166r
- Pernas, L., and Scorrano, L. (2016). Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 505–531. doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105011
- Picard, M., White, K., and Turnbull, D. M. (2013). Mitochondrial Morphology, Topology, and Membrane Interactions in Skeletal Muscle: a Quantitative Three-Dimensional Electron Microscopy Study. *J. Appl. Physiol.* 114, 161–171. doi:10.1152/jappphysiol.01096.2012
- Pila-Castellanos, I., Molino, D., McKellar, J., Lines, L., Da Graca, J., Tauziet, M., et al. (2021). Mitochondrial Morphodynamics Alteration Induced by Influenza Virus Infection as a New Antiviral Strategy. *Plos Pathog.* 17, e1009340. doi:10.1371/journal.ppat.1009340
- Porter, L., Toepfner, N., Bashant, K. R., Guck, J., Ashcroft, M., Farahi, N., et al. (2018). Metabolic Profiling of Human Eosinophils. *Front. Immunol.* 9, 1404. doi:10.3389/fimmu.2018.01404
- Samarasinghe, A. E., Melo, R. C. N., Duan, S., LeMessurier, K. S., Liedmann, S., Surman, S. L., et al. (2017). Eosinophils Promote Antiviral Immunity in Mice Infected with Influenza A Virus. *J. Immunol.* 198, 3214–3226. doi:10.4049/jimmunol.1600787
- Schober, P., and Vetter, T. R. (2021). Logistic Regression in Medical Research. *Anesth. Analg.* 132, 365–366. doi:10.1213/ane.00000000000005247
- Scott, R. E., and Horn, R. G. (1970). Fine Structural Features of Eosinophilic Granulocyte Development in Human Bone Marrow. *J. Ultrastruct. Res.* 33, 16–28. doi:10.1016/s0022-5320(70)90116-4
- Serra, M. F., Anjos-Valotta, E. A., Olsen, P. C., Couto, G. C., Jurgilas, P. B., Cotias, A. C., et al. (2012). Nebulized Lidocaine Prevents Airway Inflammation, Peribronchial Fibrosis, and Mucus Production in a Murine Model of Asthma. *Anesthesiology* 117, 580–591. doi:10.1097/aln.0b013e31826687d5
- Shamri, R., Melo, R. C. N., Young, K. M., Bivas-Benita, M., Xenakis, J. J., Spencer, L. A., et al. (2012). CCL11 Elicits Secretion of RNases from Mouse Eosinophils and Their Cell-free Granules. *FASEB J.* 26, 2084–2093. doi:10.1096/fj.11-200246
- Sugura, A., McLelland, G. L., Fon, E. A., and McBride, H. M. (2014). A New Pathway for Mitochondrial Quality Control: Mitochondrial-derived Vesicles. *EMBO J.* 33, 2142–2156. doi:10.15252/emboj.201488104
- Wang, K., and Klionsky, D. J. (2011). Mitochondria Removal by Autophagy. *Autophagy* 7, 297–300. doi:10.4161/auto.7.3.14502
- Yoshizumi, T., Ichinohe, T., Sasaki, O., Otera, H., Kawabata, S., Mihara, K., et al. (2014). Influenza A Virus Protein PB1-F2 Translocates into Mitochondria via Tom40 Channels and Impairs Innate Immunity. *Nat. Commun.* 5, 4713–4714. doi:10.1038/ncomms5713

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Bonjour, Palazzi, Silva, Malta, Neves, Oliveira-Barros, Neves, Kersten, Fortuna, Samarasinghe, Weller, Bandeira-Melo and Melo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.