

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Departamento de Morfologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Vitor Hugo Neves Nascimento

**INFILTRAÇÃO EOSINOFÍLICA EM SÍTIOS INFLAMATÓRIOS: estudo
ultraestrutural de eosinófilos após a morte celular**

Belo Horizonte

2021

Vitor Hugo Neves Nascimento

**INFILTRAÇÃO EOSINOFÍLICA EM SÍTIOS INFLAMATÓRIOS: estudo
ultraestrutural de eosinófilos após a morte celular**

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

Orientadora: Dra. Rossana Correa Netto de Melo

Belo Horizonte

2021

043 Nascimento, Vitor Hugo Neves.
Infiltração eosinofílica em sítios inflamatórios: estudo ultraestrutural de eosinófilos após a morte celular [manuscrito] / Vitor Hugo Neves Nascimento. - 2021.

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

Orientadora: Dra. Rossana Correa Netto de Melo.

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

1. Biologia Celular. 2. Eosinófilos. 3. Morte Celular. 4. Microscopia Eletrônica de Transmissão. 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 - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

VITOR HUGO NEVES NASCIMENTO

344/2021
entrada
1º/2019
2019689973

Às **quatorze horas** do dia **31 de maio de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**INFILTRAÇÃO EOSINOFÍLICA EM SÍTIOS INFLAMATÓRIOS: ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DE EOSINÓFILOS APÓS A MORTE CELULAR**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Rossana Correa Netto de Melo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Rossana Correa Netto de Melo	UFJF	Aprovação
Dra. Josiane Sabbadini Neves	UFRJ/ICB	Aprovação
Dra. Carolina Cattoni Koh	UFMG	Aprovação

Pelas indicações, o candidato foi considerado: Aprovado

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 31 de maio de 2021.**

Dr^a. Rossana Correa Netto de Melo (Orientadora)

Dra. Josiane Sabbadini Neves

Dra. Carolina Cattoni Koh

Fernanda RCL Almeida

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Rita e Vitório por todo o encorajamento e suporte sem os quais seria impossível concluir minha formação.

Aos membros do Laboratório de Biologia Celular da UFJF pela amizade, por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pelas discussões científicas enriquecedoras.

Aos membros do LABER/UFMG, em especial aos professores Hélio e Fernanda, pelo acolhimento e pela disponibilização do espaço do laboratório para a realização das minhas atividades na UFMG.

À minha orientadora, Rossana Melo, por todos os ensinamentos durante este período, pelas discussões, por toda a disponibilidade e pela confiança em mim para a realização deste trabalho.

*Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico:
ele também é uma criança enfrentando fenômenos
naturais que o impressionam como se fossem contos
de fadas*

- Marie Curie

RESUMO

Eosinófilos são células multifuncionais do sistema imune com atividades associadas à secreção de inúmeros produtos estocados em seus grânulos citoplasmáticos. Um dos principais mecanismos pelo qual o eosinófilo libera o conteúdo de seus grânulos secretores se baseia em um processo de morte celular necrótico, classicamente chamado de citólise. Este consiste no rompimento da membrana plasmática com a deposição extracelular de grânulos secretores intactos e funcionais. Evidências crescentes vêm mostrando que os grânulos não são as únicas estruturas derivadas da citólise do eosinófilo, com destaque para vesículas específicas, cristais de Charcot-Leyden e redes de DNA. Estas redes são liberadas em decorrência da ETose, um mecanismo citolítico de morte celular mais recentemente descrito, onde há deposição de cromatina na matriz extracelular em conjunto com os grânulos secretores de eosinófilos. O processo de citólise é, portanto, muito complexo e ainda pouco entendido, principalmente *in vivo*. Muitas questões acerca da ultraestrutura do processo da citólise convencional e principalmente da ETose continuam em aberto. O presente estudo teve como objetivo investigar, *in situ*, as características ultraestruturais de eosinófilos em processo de citólise em doenças inflamatórias eosinofílicas humanas. Para isso, aplicamos a microscopia eletrônica de transmissão (MET), única técnica que permite distinguir em alta resolução as formas de desgranulação do eosinófilo e suas características subcelulares, em biópsias de pacientes diagnosticados com rinosinusite crônica eosinofílica (RSCE, tecido nasal) e colite ulcerativa (tecido intestinal). Nossas análises qualitativas e quantitativas mostraram que a citólise é um dos mecanismos secretores de eosinófilos mais frequentes nas doenças estudadas e que a ETose representa uma parcela significativa destes eosinófilos. As características ultraestruturas associadas com ETose (arredondamento/delobulação nuclear, descondensação e expansão da cromatina) e liberação de redes extracelulares de cromatina foram identificadas e quantificadas em 43% dos eosinófilos em citólise. Identificamos também, pela primeira vez, alterações do envoltório nuclear (EN), representadas por dilatação do espaço perinuclear e formação de vesículas derivadas do EN. Nossas análises demonstraram que processo de ETose leva não apenas à liberação de grânulos íntegros, mas também à liberação de carreadores vesiculotubulares típicos de eosinófilos humanos, as EoSVs (*Eosinophil Sombrero Vesicles*). As EoSVs livres associam-se com grânulos livres, células inflamatórias e redes extracelulares de DNA. As EoSVs permanecem íntegras após a morte citolítica de eosinófilos humanos com potencial implicação funcional *in situ*. Por fim, identificamos grânulos livres depositados na matriz inflamada com protrusões de membrana, característica morfológica típica do brotamento vesicular. Baseando-se nessas evidências ultraestruturais, propomos que vesículas são geradas *in situ* a partir de grânulos secretores livres, mecanismo pelo qual estes grânulos liberam gradativamente seus conteúdos fora da célula. Em conjunto, nossos resultados destacam o mecanismo de morte celular citolítica como processo secretor importante de eosinófilos em doenças eosinofílicas e identificam outras vias potencialmente participantes na propagação da resposta do eosinófilo após a morte celular, com ênfase para o sistema vesicular derivado de grânulos de secreção de eosinófilos.

Palavras-chave: eosinófilos; citólise; ETose; tráfego vesicular; microscopia eletrônica de transmissão.

ABSTRACT

Eosinophils are multifunctional cells from the immune system with activities associated with the secretion of numerous products stored in their cytoplasmic granules. One of the main mechanisms by which the eosinophil releases the contents of its secretory granules is based on a necrotic cell death process, classically named cytolysis. This consists of the plasma membrane rupture with extracellular deposition of intact and functional secretory granules. Increasing evidence has shown that granules are not the only structures derived from eosinophil cytolysis, but specific vesicles, Charcot-Leyden crystals and DNA nets are also released. Nets are released through ETosis, a more recently described cytolytic cell death mechanism where there is deposition of chromatin together with eosinophil secretory granules, in the extracellular matrix (ECM). The cytolysis process is, therefore, very complex and still poorly understood, mainly *in vivo*. Many questions about the ultrastructure of both the conventional cytolysis process and mainly about ETosis remain open. The present study aimed to investigate, *in situ*, the ultrastructural characteristics of eosinophils undergoing cytolysis in human eosinophilic inflammatory diseases. For this, we applied transmission electron microscopy (TEM), the only technique that allows distinguishing in high resolution the eosinophil degranulation mechanisms and its subcellular characteristics, to biopsies of patients diagnosed with eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS, nasal tissue) and ulcerative colitis (intestinal tissue). Our qualitative and quantitative analyzes showed that cytolysis is one of the most frequent secretory mechanisms of eosinophils in the studied diseases and that ETosis represents a significant portion of these eosinophils. More than 40% of cytolytic eosinophils presented ultrastructural characteristics associated with ETosis (nuclear rounding/delobulation, chromatin decondensation and expansion) and release of chromatin extracellular nets. For the first time, we also identified changes in the nuclear envelope (NE), represented by dilation of the perinuclear space and formation of vesicles derived from the NE. Our analyses showed that the process of ETosis leads not only to the deposition of intact granules, but also to the release of typical human eosinophils' vesiculotubular carriers, the EoSVs (Eosinophil Sombrero Vesicles). Free intact EoSVs were associated with free granules, inflammatory cells and extracellular DNA nets. EoSVs remain intact after the cytolytic death of human eosinophils with potential functional implications *in situ*. Finally, we identified free granules deposited in the inflamed matrix with membrane protrusions, a typical morphological characteristic of vesicular formation. Based on this ultrastructural evidence, we propose that EoSVs are generated *in situ* from free secretory granules, a mechanism by which these granules gradually release their contents in the ECM. Together, our results highlight the mechanisms of cytolytic cell death as an important eosinophil secretory process in eosinophilic diseases and identify other pathways potentially participating in the propagation of the eosinophil response after cell death, with emphasis on the vesicular system derived from eosinophil secretory granules.

Keywords: eosinophil; cytolysis; ETosis; vesicular traffic; transmission electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Aspectos morfológicos do eosinófilo.....	18
Figura 2.	Mecanismos de secreção do eosinófilo.....	19
Figura 3.	Características ultraestruturais da exocitose.....	21
Figura 4.	Características ultraestruturais da desgranulação por piecemeal (PMD).....	23
Figura 5.	Vesículas secretoras de eosinófilos humanos/ <i>Eosinophil Sombbrero Vesicles</i> (EoSVs).....	26
Figura 6.	Características ultraestruturais da citólise.....	28
Figura 7.	ETose do eosinófilo.....	35
Figura 8.	Cristais de Charcot-Leyden (CLCs).....	38
Figura 9.	Presença de EoSVs no tecido após a citólise.....	39
Figura 10.	Mecanismos secretores de eosinófilos teciduais em doenças eosinofílicas.....	47
Figura 11.	Diferentes estágios de eosinófilos citolíticos teciduais em doenças eosinofílicas.....	48
Figura 12.	Evidências ultraestruturais da liberação de ETs do eosinófilo in vivo.....	50
Figura 13.	Frequência das características ultraestruturais da ETose de eosinófilos nas doenças eosinofílicas.....	53
Figura 14.	Expansão da cromatina em núcleos intactos de eosinófilos teciduais in vivo.....	54
Figura 15.	Alterações do envoltório nuclear durante a citólise do eosinófilo em doenças eosinofílicas.....	57
Figura 16.	Separação e expansão de envoltório nuclear durante a citólise do eosinófilo.....	58
Figura 17.	Vesículas nucleares formadas durante a citólise do eosinófilo in vivo.....	59
Figura 18.	Presença de EoSVs no meio extracelular após a morte do eosinófilo.....	61
Figura 19.	Integridade de EoSVs após a morte citolítica do eosinófilo em doenças eosinofílicas.....	62
Figura 20.	Proximidade entre grânulos e EoSVs livres no tecido após a morte citolítica do eosinófilo.....	64
Figura 21.	EoSVs entremeadas aos feixes de colágeno da matriz extracelular nas biópsias de doenças eosinofílicas.....	65

Figura 22.	EoSVs livres próximas a células do tecido inflamado de doenças eosinofílicas.....	66
Figura 23.	EoSVs livres próximas a células e armadilhas de DNA no tecido....	67
Figura 24.	Proporções de EoSVs associadas às armadilhas de DNA no tecido.....	69
Figura 25.	Citólise do eosinófilo em um pequeno vaso sanguíneo no tecido nasal.....	70
Figura 26.	Grânulos depositados nos tecidos de doenças eosinofílicas mostram protrusões de membrana similares a brotamentos vesiculares.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Número de conteúdos nucleares e de suas características ultraestruturais estudadas nas biópsias.....	43
Tabela 2.	Número de micrografias para análise quantitativa da integridade de EoSVs.....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BFA	Brefeldina A
CCL	Ligante de Quimiocinas de Motivo CC
CCR	Receptor de Citocina De Motivo CC
CLC	Cristal de Charcot-Leyden
cysLT	Leucotrieno Cisteínico
DAMP	Padrão Molecular Associado ao Dano
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ECP	Proteína Catiônica do Eosinófilo
EDN	Neurotoxina Derivada do Eosinófilo
EET	Rede Extracelular de DNA do Eosinófilo
EETose	ETose do Eosinófilo
EoSV	<i>Eosinophil Sombrero Vesicle</i>
EPO	Peroxidase Eosinofílica
ET	Rede Extracelular de DNA (<i>Extracellular Trap</i>)
FEG	Grânulo de Eosinófilo Livre
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GTP γ S	Guanosina 5'-O-[gama] Trifosfato
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL-R	Receptor de Interleucina
INF- γ	Interferon Gama
LT	Leucotrieno
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MBP	Proteína Básica Principal
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MPO	Mieloperoxidase
NE	Elastase de Neutrófilos
NET	Rede Extracelular de DNA do Neutrófilo
NETose	ETose do Neutrófilo
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PDI	Dissulfeto Isomerase
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase

PKC	Proteína Quinase C
PMA	Phorbol-12-Miristato-13-Acetato - Acetato miristato de forbol
PMD	Desgranulação por Piecemeal
RANTES	Regulador de Ativação Expresso e Secretado por Células T Normais
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RSCE	Rinossinusite Crônica Eosinofílica
SNARE	Proteína Receptora de Ligação ao Fator Solúvel Sensível N-etilmaleimida
TE	Tomografia Eletrônica
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VN	Vesícula Nuclear

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Eosinófilos: células multifuncionais	15
1.2. Grânulos secretores	17
1.3. Exocitose	20
1.4. Desgranulação por <i>piecemeal</i>	22
1.4.1. Sistema vesicular do eosinófilo	24
1.5. Citólise	27
1.5.1. Ocorrência em doenças eosinofílicas	27
1.5.2. Grânulos livres e suas influências	30
1.5.3. Grânulos como organelas secretoras independentes da célula	31
1.6. Citólise: muito além dos grânulos	33
1.6.1. ETose	33
1.6.2. Cristais de Charcot-Leyden	37
1.6.3. Vesículas derivadas da citólise	39
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivos gerais	40
3.2. Objetivos específicos	40
4. METODOLOGIA	41
4.1. Pacientes e biópsias	41
4.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	41
4.3. Análises ultraestruturais	42
4.3.1. Avaliação dos processos de desgranulação	42
4.3.2. Análise qualitativa e quantitativa dos aspectos nucleares	43
4.3.3. Análise qualitativa e quantitativa de EoSVs	44
4.4. Análises estatísticas	45

5. RESULTADOS	46
5.1. PMD e citólise são os mecanismos mais frequentes de desgranulação de eosinófilo na colite ulcerativa e RSCE.....	46
5.2. Eosinófilos teciduais sofrendo ETose são frequentemente observados na colite ulcerativa e RSCE.....	49
5.2.1. Evidências ultraestruturais da liberação de ETs são observadas no tecido após a ruptura do eosinófilo.....	49
5.2.2. Alterações da cromatina antes da formação de ETs.....	51
5.3. Alterações do envoltório nuclear estão relacionados com a citólise in vivo.....	55
5.4. Vesículas secretoras de eosinófilos mantêm a integridade após a morte celular.....	60
5.5. Vesículas típicas de eosinófilos são encontradas próximas de diversas estruturas na matriz extracelular.....	63
5.6. Grânulos depositados no tecido inflamado mostram sinais de formação de vesículas.....	70
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÕES	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Eosinófilos: células multifuncionais

Eosinófilos são leucócitos do sistema imune inato, considerados células multifuncionais por possuírem atividades tanto em processos inflamatórios, incluindo infecções parasitárias e condições alérgicas, como em mecanismos de imunorregulação e homeostase tecidual (Rothenberg e Hogan, 2006; Kita, 2013; Rosenberg *et al.*, 2013; Weller e Spencer, 2017). Eosinófilos se desenvolvem a partir de precursores mieloides na medula óssea e são liberados para o sangue periférico quando maduros (Kouro e Takatsu, 2009). Estas células representam menos de 5% dos leucócitos do sangue, mas estas taxas podem aumentar em decorrência de diversas condições patológicas (Fulkerson e Rothenberg, 2013). A partir do sangue, os eosinófilos são capazes de serem ativados e recrutados para os tecidos pela ação de diversos estímulos, como a interleucina-5 (IL-5) e a eotaxina (CCL11) (Rothenberg e Hogan, 2006; Mcbrien e Menzies-Gow, 2017).

Em alguns órgãos, os eosinófilos são células residentes, atuando na manutenção da homeostase tecidual (Weller e Spencer, 2017). No intestino, por exemplo, eosinófilos residentes auxiliam na sustentação da imunidade da mucosa, influenciando a produção de IgA e a manutenção do tecido linfoide (Chu *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2015). A ausência dessas células está associada a uma desregulação da microbiota e da barreira epitelial intestinal (Chu *et al.*, 2014). Eosinófilos também influenciam o desenvolvimento normal de órgãos tais como o timo, as glândulas mamárias e o útero. No timo, eosinófilos são recrutados principalmente no início do estágio de involução do órgão, possivelmente participando deste processo pela indução da apoptose de timócitos (Throsby *et al.*, 2000). Juntamente com macrófagos, os eosinófilos promovem a ramificação e modelamento dos ductos das glândulas mamárias em desenvolvimento (Gouon-Evans *et al.*, 2002) e estão presentes no útero em diversas fases do ciclo reprodutivo (Diener *et al.*, 2016), apresentando ações tanto de degradação como de regeneração tecidual (Knudsen *et al.*, 1997; Timmons *et al.*, 2009). De fato, eosinófilos exibem certa capacidade de reparo tecidual, podendo participar da regeneração do tecido hepático e muscular (Goh *et al.*, 2013; Heredia *et al.*, 2013). No tecido adiposo, eosinófilos estão intimamente relacionados com homeostase metabólica e termorregulação (Wu *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2014). Na

medula óssea, estimulam o desenvolvimento e a sobrevivência de plasmócitos (Fröhlich *et al.*, 2011; Chu e Berek, 2012).

Os eosinófilos realizam uma alta gama de interações celulares com outros tipos de leucócitos, possuindo alto potencial imunorregulador. Estas células são capazes de promover a proliferação, ativação e polarização (Th1 ou Th2) de Linfócitos T, tanto pela secreção de citocinas como pela apresentação de antígenos (Mawhorter *et al.*, 1994; Mackenzie *et al.*, 2001; Shi, 2004). Os eosinófilos conseguem processar uma variedade de antígenos microbianos, virais e parasitários (Shi, 2004). Mastócitos também podem ser ativados em decorrência das ações do eosinófilo, liberando diversos produtos envolvidos na resposta inflamatória, como a histamina (Piliponsky *et al.*, 2002). Além disso, eosinófilos possuem um forte potencial autócrino, produzindo sinais que induzem a ativação e sobrevivência de outros eosinófilos (Radke *et al.*, 2009; Luna-Gomes *et al.*, 2011; Willebrand e Voehringer, 2016).

Em infecções, os eosinófilos são classicamente descritos como células com atividade antiparasitária (Butterworth e David, 1981). Estas células estão presentes em grande número tanto nos locais da infecção quanto no sangue circulante de indivíduos infectados com várias espécies de parasitos, principalmente helmintos. No entanto, as funções dos eosinófilos em infecções parasitárias são alvo de debates mais recentes, com indícios de que estejam mais envolvidos na imunorregulação do ambiente inflamatório do que na destruição direta do parasito (Klion e Nutman, 2004; Huang e Appleton, 2016). Diversos trabalhos também vêm mostrando o papel protetivo do eosinófilo em infecções virais, principalmente em vírus de RNA respiratórios (Adamko *et al.*, 1999; Samarasinghe *et al.*, 2017; Flores-Torres *et al.*, 2019). Aqui, agem tanto diretamente, pela secreção de ribonucleases, quanto indiretamente, pela regulação do sistema imune (Rosenberg e Domachowske, 2001; Flores-Torres *et al.*, 2019).

Atividades desreguladas do eosinófilo, que podem estar relacionadas a sua biogênese, recrutamento ou ativação, levam ao surgimento de diversas doenças. Um exemplo claro dos efeitos deletérios do excesso de eosinófilos e da ativação desta célula no organismo está na síndrome hipereosinofílica, caracterizada pelo número excessivo ($>1500/\text{mm}^3$) de eosinófilos no sangue (Curtis e Ogbogu, 2016). Esta é uma doença de etiologia pouco conhecida, com manifestações que variam desde casos assintomáticos a casos severos de dano tecidual e falha terminal de órgãos, estes

podendo atingir diversos sistemas, como o cardiovascular, respiratório, neural, renal e gastrointestinal (Curtis e Ogbogu, 2016). O eosinófilo está intimamente relacionado com diversas patologias associadas ao trato respiratório, em especial aquelas de cunho alérgico, como asma e rinosinusite (Shah *et al.*, 2016; McBrien e Menzies-Gow, 2017). Nessas condições, os eosinófilos participam ativamente na indução da resposta inflamatória, que irá ocasionar em dano epitelial, produção excessiva de muco e contração do músculo liso dos brônquios, este último estando mais relacionado à asma (Shah *et al.*, 2016; McBrien e Menzies-Gow, 2017). A soma destes fatores irá exacerbar a obstrução das vias aéreas e piorar o prognóstico das doenças. Sendo importantes células residentes da mucosa intestinal, o desbalanço no funcionamento de eosinófilos também está diretamente relacionado com condições do trato gastrointestinal, com destaque para as chamadas Doenças Inflamatórias Intestinais, que abrangem a Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa (Woodruff *et al.*, 2011; Mehta *et al.*, 2015; Filippone *et al.*, 2019).

A multifuncionalidade do eosinófilo se baseia na secreção de uma infinidade de componentes produzidos por estas células. A grande maioria destes produtos se encontra armazenada no interior de estruturas extremamente dinâmicas conhecidas como grânulos específicos ou secretores, que compõem a maior população de organelas citoplasmáticas desta célula.

1.2. Grânulos secretores

Os eosinófilos integram o grupo dos granulócitos polimorfonucleares, cujas principais características são um núcleo segmentado (multilobulado), frequentemente bilobulado no caso dos eosinófilos, a presença de grânulos citoplasmáticos (Figura 1). Em eosinófilos, os grânulos específicos armazenam grande quantidade de proteínas básicas, conferindo a estas células uma forte afinidade por corantes ácidos (acidofilia), como a eosina, e resultante coloração rósea quando observada pela microscopia de luz (Figura 1A) (Lee *et al.*, 2012; Rosenberg *et al.*, 2013). Os eosinófilos armazenam diferentes tipos de proteínas catiônicas, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas no interior de seus grânulos (Rosenberg *et al.*, 2013; Weller e Spencer, 2017). Dentre estas destacam-se quatro proteínas catiônicas principais: a proteína básica principal (MBP – *major basic protein*), a peroxidase eosinofílica (EPO –

eosinophilic peroxidase) e as proteínas com atividades de ribonucleases, como a proteína catiônica do eosinófilo (ECP – *eosinophil cationic protein*) e a neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN – *eosinophil derived neurotoxin*) (Acharya e Ackerman, 2014). Importante destacar que estes componentes se acumulam nos grânulos do eosinófilo durante o processo de maturação celular e se encontram pré-formadas no interior de grânulos maduros, e prontos para liberação após ativação celular (Muniz *et al.*, 2012; Melo e Weller, 2018).

Os grânulos do eosinófilo também são fundamentais para a identificação morfológica desta célula pela microscopia eletrônica de transmissão (MET). Estas

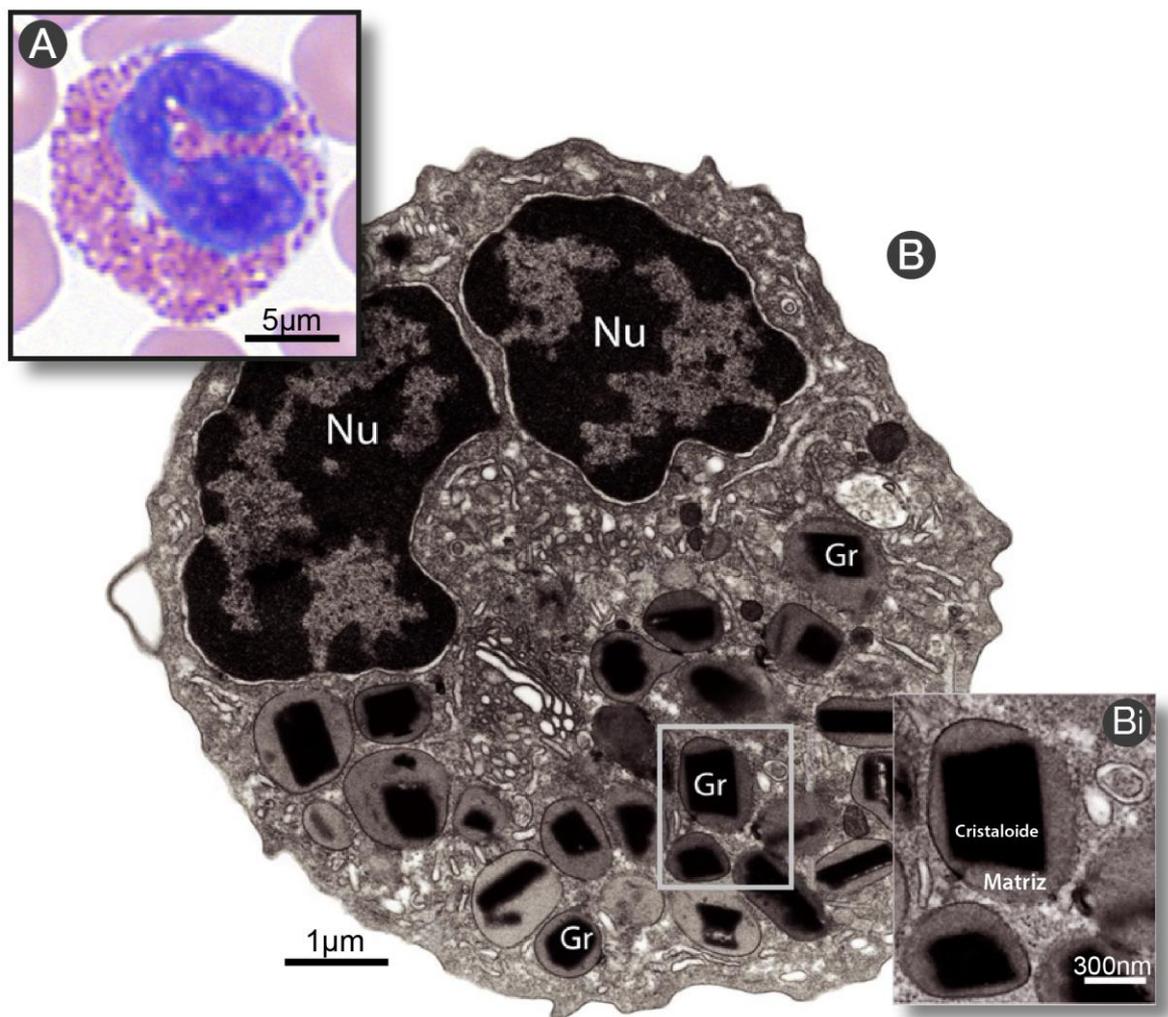


Figura 1 – Aspectos morfológicos do eosinófilo. (A) Eosinófilo humano corado por Giemsa (azul de metileno + eosina), mostrando núcleo bilobado (arroxeado) e citoplasma granular róseo. **(B)** Microscopia eletrônica de transmissão de um eosinófilo humano. Note o típico núcleo bilobado (Nu) e os grânulos secretores (Gr). **(Bi)** Destaque para um grânulo secretor, mostrando matriz e núcleo cristalóide (core) intactos. **(A)** Adaptado de Lee *et al.* 2012. **(B)** Adaptado de Spencer *et al.* 2014.

organelas apresentam morfologia única com uma região central elétron-densa, chamada de cristalóide envolta por uma matriz mais elétron lúcida (Figura 1B) (Melo *et al.*, 2012; Spencer *et al.*, 2014; Melo e Weller, 2018). O núcleo cristalóide possui esta denominação por se tratar de uma estrutura formada pela cristalização de proteínas dos grânulos, principalmente MBP (Muniz *et al.*, 2012). Importante destacar que a elétron-densidade dos grânulos varia dependendo do grau de ativação do eosinófilo. Os grânulos se tornam mais elétron-lúcidos, podendo haver perda do cristalóide naqueles altamente ativados, sinalizando uma perda de conteúdo.

Eosinófilos são células tipicamente secretoras as quais liberam seus produtos por meio de três mecanismos de secreção distintos: i) exocitose, ii) desgranulação por *piecemeal* (PMD – *piecemeal degranulation*) e iii) citólise (Melo *et al.*, 2013; Spencer *et al.*, 2014) (Figura 2). Entender a ultraestrutura do eosinófilo é fundamental para o estudo destes mecanismos de secreção, já que a MET é a técnica mais apropriada para identificá-los (Melo *et al.*, 2010a).



Figura 2 – Mecanismos de secreção do eosinófilo. Exocitose: Fusão de grânulos com a membrana plasmática; Desgranulação por *Piecemeal*: liberação gradual e seletiva de produtos dos grânulos mediada por transporte vesicular; Citólise: rompimento da membrana plasmática com deposição tecidual de grânulos secretores íntegros. Adaptada de Spencer *et al.* 2014.

1.3. Exocitose

A exocitose é um processo de desgranulação que consiste na fusão dos grânulos com a membrana plasmática, seguido da liberação de todo o conteúdo armazenado por estas organelas para o meio extracelular (Logan *et al.*, 2003). Este mecanismo pode ocorrer de duas formas, denominadas exocitose clássica e exocitose composta. A primeira, consiste em um evento de fusão discreto, onde grânulos individuais se fundem com a membrana da célula. Enquanto a segunda é caracterizada por múltiplas fusões entre grânulos, que formam grandes câmaras, ou vacúolos, no interior da célula, antes da ocorrência de fusão com a membrana plasmática (Scepek *et al.*, 1994; Logan *et al.*, 2003). Na exocitose composta, essas estruturas originadas a partir da fusão entre grânulos, ao se fundirem com a membrana plasmática formam um grande “poro de secreção”, onde todo o conteúdo de um conjunto de grânulos é liberado de uma única vez, de forma concentrada, sobre uma superfície alvo (Scepek *et al.*, 1994).

A exocitose de grânulos do eosinófilo ocorre através de uma série de eventos altamente regulados: i) mobilização ou translocação de grânulos para a periferia da célula (Figura 3A); ii) acoplamento entre o grânulo e a membrana plasmática; iii) fusão das membranas e liberação do mediador (Figura 3B) (Logan *et al.*, 2003).

Este mecanismo de secreção pode ser observado *in vitro*, na interação de eosinófilos com parasitos helmintos (Mclaren *et al.*, 1977). Nesta situação, a exocitose composta com a formação de grandes vacúolos de secreção fica bem evidente (Figuras 3C e D), e a secreção frequentemente é observada diretamente sob a superfície do parasito (Figura 3D). *In vitro*, a exocitose também pode ser fortemente estimulada pela ação do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α – *Tumor Necrosis Factor Alfa*) (Carmo *et al.*, 2016; Carmo *et al.*, 2018). Também há relatos de sua indução por estímulos com IgA e IgG (Weiler *et al.*, 1996), guanosina 5'-O-[gama] trifosfato (GTP γ S) (Hafez *et al.*, 2003) e ionóforo de cálcio A23187 (Henderson e Chi, 1985). *In vivo*, no entanto, a exocitose é raramente observada. Mesmo havendo relatos de sua ocorrência em condições patológicas, como em doenças inflamatórias intestinais (Dvorak *et al.*, 1993), evidências deste evento nos tecidos são escassas (Melo *et al.*, 2013).

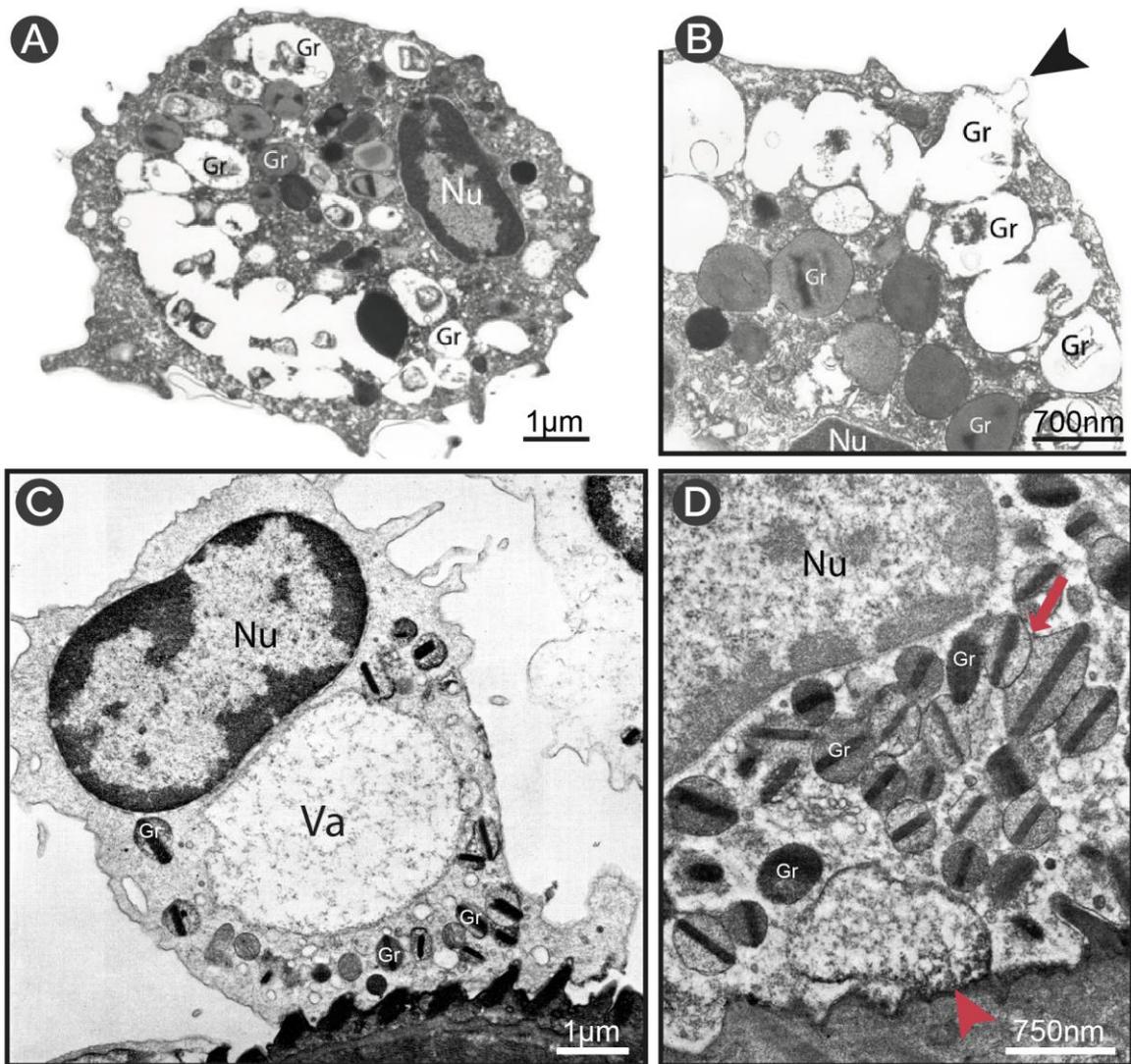


Figura 3 – Características ultraestruturais da exocitose. (A) Eosinófilo humano estimulado com Fator de Necrose Tumoral Alfa, apresentando diversos grânulos fundidos translocados para a periferia celular (região altamente elétron-lúcida). **(B)** Célula na mesma condição anterior, com destaque para uma região de fusão do grânulo com a membrana plasmática (cabeça de seta). **(C)** Eosinófilo de rato em co-cultura com larvas de *Shistosoma mansoni* aderido à parede do parasito e apresentando um grande vacúolo citoplasmático (Va) em decorrência da fusão de grânulos. **(D)** Célula na mesma condição anterior, com destaque para uma região de fusão do vacúolo com a membrana plasmática (cabeça de seta), na superfície do parasito. Seta aponta uma fusão entre grânulos. **(A e B)** adaptados de Carmo *et al.* 2016. **(C e D)** adaptados de McLaren *et al.* 1977. (Nu) Núcleo, (Gr) grânulos.

1.4. Desgranulação por *piecemeal*

O termo desgranulação por *piecemeal* foi proposto nos anos 70, para descrever um padrão ultraestrutural de secreção celular primeiramente observado em basófilos presentes nos tecidos durante condições inflamatórias (Dvorak *et al.*, 1974; Dvorak *et al.*, 1976). Este processo consiste no transporte vesicular de pequenas quantidades de conteúdos estocados no interior de grânulos secretores para a superfície celular (Melo e Weller, 2010). Desta forma, células em PMD exibem grânulos parcialmente vazios (Crivellato *et al.*, 2003; Melo e Weller, 2010). A PMD é um mecanismo também encontrado em células endócrinas, mas possui especial importância em células do sistema imune, tais como basófilos, mastócitos e eosinófilos (Crivellato *et al.*, 2003; Melo e Weller, 2010).

Em eosinófilos, a desgranulação por *piecemeal* pode ser identificada principalmente pelas alterações ultraestruturais dos grânulos secretores, que incluem: aumento de volume do grânulo, desorganização do núcleo cristalóide e redução da elétrondensidade da matriz e do cristalóide (Figura 4A) (Melo *et al.*, 2005a; Melo e Weller, 2010). A membrana limitante do mesmo é, por sua vez, mantida. Além disso, o esvaziamento ocorre em paralelo com a formação de vesículas derivadas dos grânulos que carregam seu conteúdo de secreção. (Melo *et al.*, 2005a; Melo *et al.*, 2008b). Estas vesículas se encontram destacadas em rosa na Figura 4A e o mecanismo exemplificado na ilustração da Figura 4B.

Em eosinófilos, a PMD é o processo secretor mais frequentemente observado *in vivo*, sendo documentado em diversas situações inflamatórias (Dvorak, 1980; Karawajczyk *et al.*, 2000; Erjefält *et al.*, 2001; Ahlstrom-Emanuelsson *et al.*, 2004). *In vitro*, este mecanismo secretor é estimulado por clássicos agonistas inflamatórios do eosinófilo, como o CCL5/RANTES, CCL11/eotaxina e PAF (fator ativador de plaquetas – *platelet-activating factor*) (Melo *et al.*, 2005a). Enquanto eosinófilos não estimulados possuem apenas 8% dos grânulos com características de PMD, células estimuladas apresentam um significativo aumento no percentual de grânulos em esvaziamento, 25% para eosinófilos estimulados com CCL5, 43% para aqueles estimulados com CCL11 e 34% nos estimulados com PAF (Melo *et al.*, 2005a). Sendo o transporte vesicular um importante fator na PMD, o pré-tratamento com Brefeldina A (BFA), um

clássico inibidor de transporte vesicular (Nebenführ *et al.*, 2002), diminui o esvaziamento dos grânulos induzido por agonista (Melo *et al.*, 2005a).

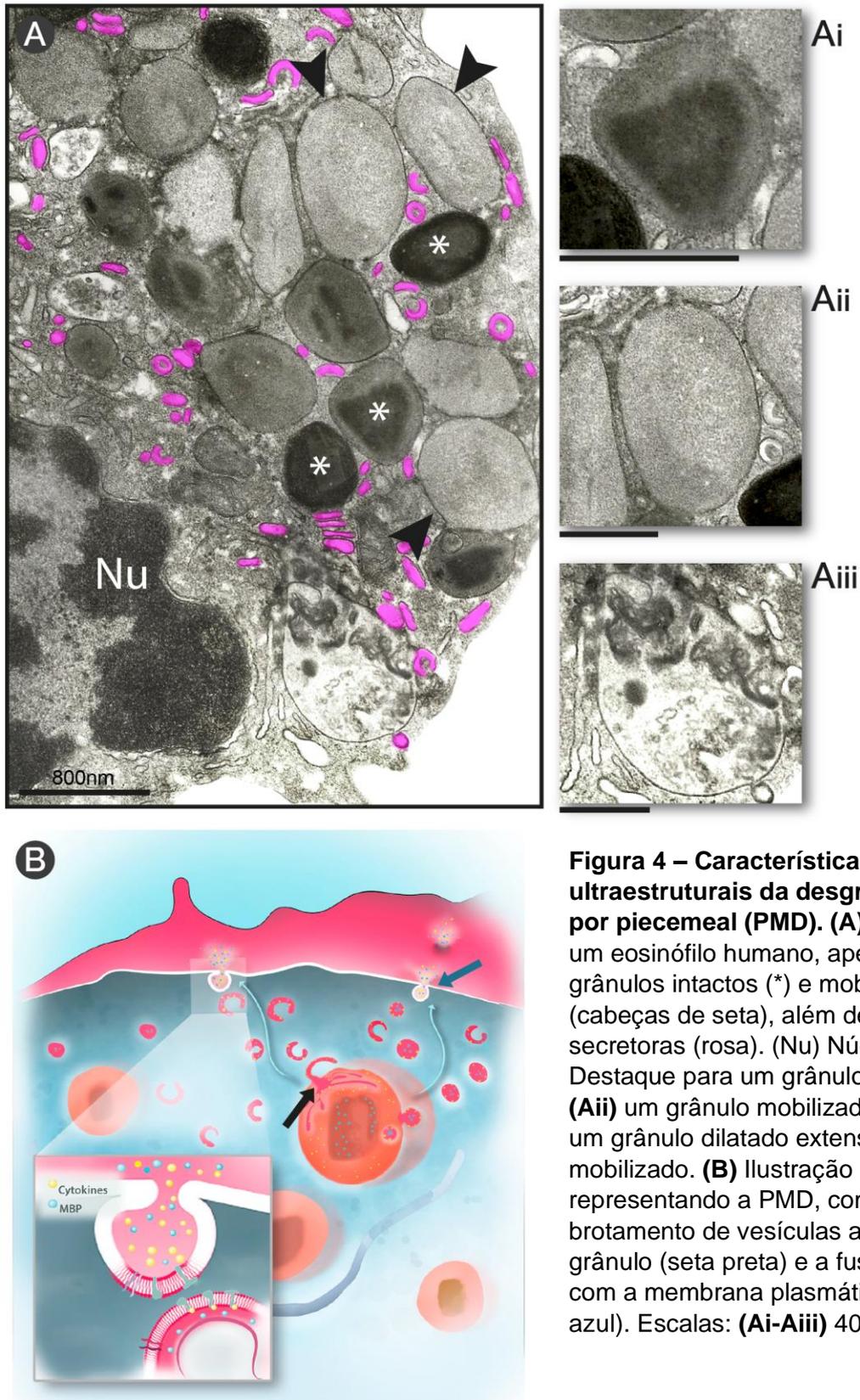


Figura 4 – Características ultraestruturais da desgranulação por piecemeal (PMD). (A) MET de um eosinófilo humano, apresentando grânulos intactos (*) e mobilizados (cabeças de seta), além de vesículas secretoras (rosa). (Nu) Núcleo. **(Ai)** Destaque para um grânulo intacto, **(Aii)** um grânulo mobilizado e **(Aiii)** um grânulo dilatado extensamente mobilizado. **(B)** Ilustração representando a PMD, com brotamento de vesículas a partir do grânulo (seta preta) e a fusão destas com a membrana plasmática (seta azul). Escalas: **(Ai-Aiii)** 400nm.

1.4.1. Sistema vesicular do eosinófilo

O transporte vesicular é um mecanismo fundamental para a desgranulação por *piecemeal* (Crivellato *et al.*, 2003; Melo e Weller, 2010) e os eosinófilos humanos, em especial, possuem um sistema vesicular extremamente proeminente e característico que participa ativamente deste mecanismo de secreção (Melo *et al.*, 2008a; Melo *et al.*, 2008b; Melo e Weller, 2010). Este sistema é composto por vesículas grandes (~150-300nm de diâmetro) e tubulares que apresentam morfologias extremamente características quando observadas pela MET (Melo *et al.*, 2005b; Melo *et al.*, 2008b). Elas podem se apresentar com uma área central de citoplasma envolvida por uma borda circular delimitada por membrana, com uma morfologia em formato de um “C”, ou ainda podendo apresentar um formato tubular achatado e alongado (Figura 5A) (Melo *et al.*, 2005b; Melo *et al.*, 2008b). Tão característica é a morfologia destas vesículas, que elas receberam um nome próprio, sendo chamadas de *Eosinophil Sombrero Vesicles* (EoSVs), pelo fato de apresentarem semelhança com o chapéu mexicano (sombbrero) quando vistos em secções transversais (Melo *et al.*, 2005b; Melo *et al.*, 2008b). Devido a seu tamanho proeminente e a sua morfologia, as EoSVs possuem superfícies de membrana mais extensas quando comparadas com as vesículas classicamente envolvidas em transporte intracelular, normalmente esféricas e pequenas (~50-100nm de diâmetro), tornando o transporte vesicular do eosinófilo muito eficiente (Melo *et al.*, 2005b; Melo *et al.*, 2008b).

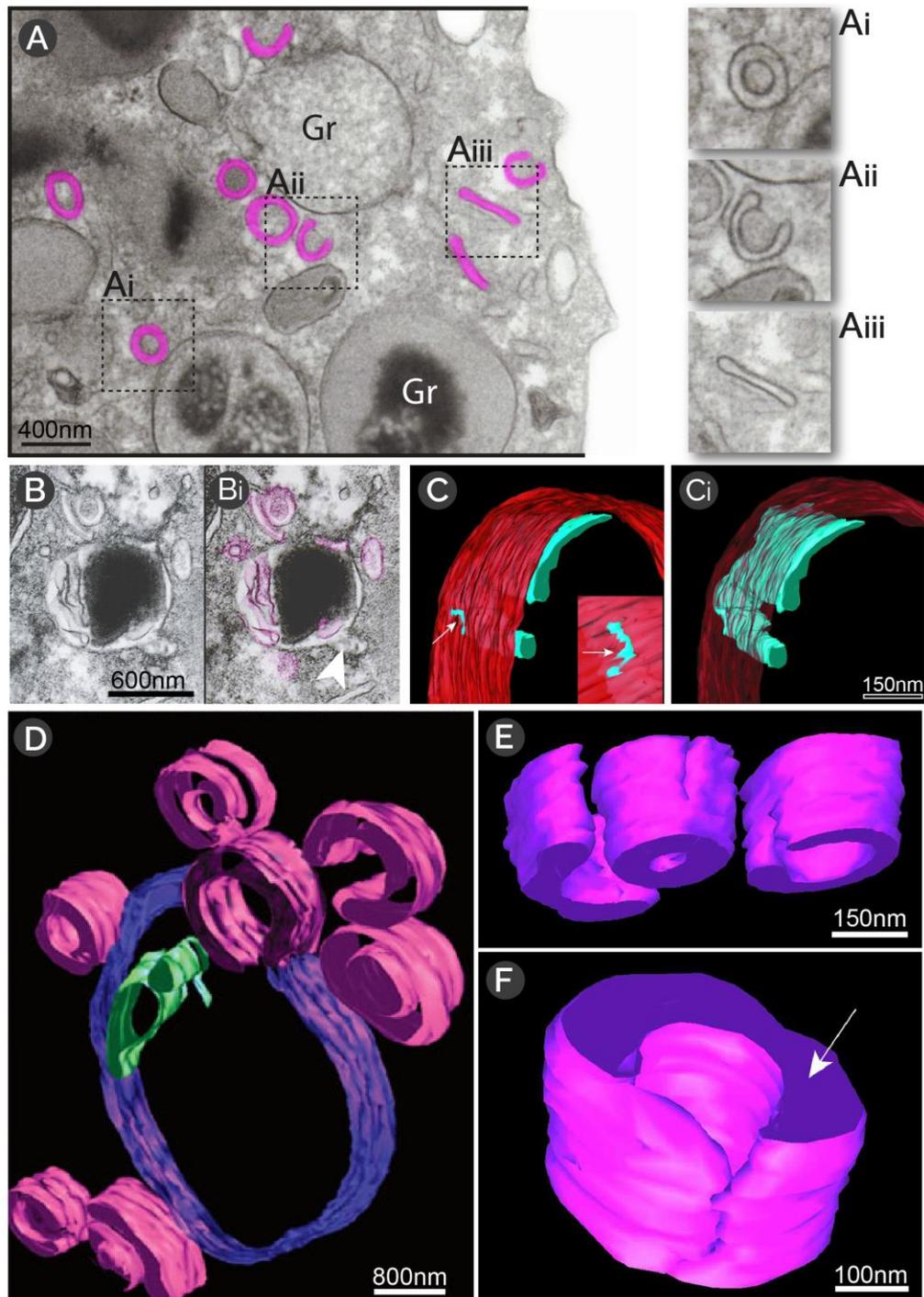
As EoSVs eram inicialmente denominadas na literatura como “microgrânulos”, a fim de descrever esta população distinta de organelas observadas no citoplasma do eosinófilo (Schaefer *et al.*, 1973). Depois de um tempo, a ideia de que estas estruturas eram na verdade vesículas começou a ganhar força (Dvorak e Weller, 2000), até que estudos combinados de MET e tomografia eletrônica revelaram a estrutura tridimensional das EoSVs, mostrando que elas são um sistema dinâmico e que de fato podem surgir de grânulos de eosinófilos mobilizados (Figuras 5B a F) (Melo *et al.*, 2005a; Melo *et al.*, 2005b; Melo *et al.*, 2007). Nestes estudos, os grânulos se mostraram como organelas elaboradas e compartimentalizadas, com complexos domínios vesiculotubulares de membrana em seu interior (Figura 5B) (Melo *et al.*, 2005a). Este sistema de membranas é formado em decorrência da estimulação celular, sendo capaz de sequestrar e realocar produtos do grânulo (Melo *et al.*, 2005a). Também foi mostrado que a quantidade de EoSVs está diretamente relacionada com

a presença de grânulos em esvaziamento (Melo *et al.*, 2005b). As EoSVs são frequentemente observadas em contato com os grânulos específicos e aparentemente brotando a partir deles, em células estimuladas (Figura 5B) (Melo *et al.*, 2005b). Uma evidência muito forte da origem destas vesículas foi a observação a partir da tomografia eletrônica, que mostra claramente a formação de compartimentos membranares intragranulares (Figura 5C e D; em verde) e o brotamento de EoSVs a partir dos grânulos (Figura 5D; EoSVs em rosa e grânulos em roxo) (Melo *et al.*, 2005b). A tomografia eletrônica também evidenciou a estrutura tridimensional das EoSVs, destacando sua morfologia única (Figuras 5E e F). O uso da BFA, diminuiu a formação de EoSVs e causou o colapso dos compartimentos de membrana no interior dos grânulos, mostrando não apenas a forte relação entre estas duas estruturas presentes em eosinófilos ativados, mas também que as EoSVs são realmente sistemas vesiculares (Melo *et al.*, 2005a; Melo *et al.*, 2005b).

Trabalhos com imunomarcção ultraestrutural mostraram que as EoSVs podem carrear proteínas e mediadores imunes típicos dos grânulos do eosinófilo, como MBP (Melo *et al.*, 2009), Interferon-gama (INF- γ) (Carmo *et al.*, 2018) e IL-4 (Melo *et al.*, 2005b). Foi mostrado que a IL-4, em especial, é sequestrada nos grânulos e carregada pelas EoSVs por meio de receptores de membrana, que estão presentes tanto nos grânulos quanto nas próprias EoSVs (Spencer *et al.*, 2006). Também foi demonstrado que eosinófilos possuem uma quantidade substancial de outros receptores de citocinas associados aos grânulos e às vesículas, como os IL-6R α e IL-13R α 1. Estoques de CCR3 intracelulares também são encontrados em eosinófilos humanos, e sua detecção é aumentada após estímulo que induz a liberação de CCL5, conhecido como um ligante de CCR3 (Spencer *et al.*, 2006). A partir destes estudos, foi proposto um modelo através do qual receptores presentes nos grânulos e vesículas medeiam o trânsito de citocinas estocadas intracelularmente (Melo *et al.*, 2013).

Além de mediadores imunes, as EoSVs apresentam outros tipos de proteínas, como a dissulfeto isomerase (PDI) (Dias *et al.*, 2014), que é tipicamente associada ao retículo endoplasmático, envolvida no dobramento de proteínas (Turano *et al.*, 2002; Laurindo *et al.*, 2012), mas podendo também estar localizada em outros compartimentos celulares (Turano *et al.*, 2002). Em leucócitos especificamente pode estar envolvida na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) (Laurindo *et al.*, 2008), em processos de adesão (Hahm *et al.*, 2013) e

possivelmente em ações anti-inflamatórias (Gadgil *et al.*, 2003). A ação da PDI nos eosinófilos e a significância de sua presença nas EoSVs é desconhecida. As EoSVs também expressam proteínas que estão relacionadas com o processo de fusão de membranas e a secreção celular, como a tetraspanina CD63 (Carmo *et al.*, 2016) e a sintaxina17, um membro da família das SNAREs (Carmo *et al.*, 2015).



▲ **Figura 5 – Vesículas secretoras de eosinófilos humanos/Eosinophil Sombrero Vesicles (EoSVs).** (A) Eosinófilo humano visto pela MET com destaque para as EoSVs (rosa). Maior aumento de EoSVs destacando suas morfologias típicas: (Ai) arredondada com área central citoplasmática; (Aii) em forma de “C”; (Aii) achatada e alongada. (B) Grânulo de eosinófilo com compartimentos membranares em seu interior e EoSVs ao seu redor, ambos evidenciados em rosa em Bi, onde também é possível ver uma região de brotamento de vesícula (cabeça de seta). (C) Modelo em 3D obtido pela técnica de tomografia eletrônica (TE) evidenciando um grânulo (vermelho) e o compartimento de membrana em seu interior (verde), com uma área de continuidade entre ambas as membranas (seta). (D) Reconstrução por TE da organização ultraestrutural de EoSVs (rosa), com a membrana limitante do grânulo (azul) e o compartimento de membrana intragranular (verde). (E e F) Reconstrução 3D de EoSVs, em (F) a seta aponta para o lúmen tubular da vesícula. (B) Adaptado de Melo *et al.* 2005. (C; E e F) Adaptado de Melo *et al.* 2007. (D) Adaptado de Melo *et al.* 2010.

1.5. Citólise

A citólise, nome que para muitos tipos celulares pode significar simplesmente a ruptura da célula, é para o eosinófilo o nome de um importante mecanismo de liberação do conteúdo dos grânulos (Spencer *et al.*, 2014). Desta forma, o eosinófilo sofre um processo de morte onde há a ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático. No entanto, os seus grânulos secretores permanecem íntegros e depositados nos tecidos após este processo (Figura 6). Os grânulos de eosinófilos livres da célula, comumente chamados de FEGs (*free eosinophil granules*), retêm sua capacidade secretora, sendo totalmente funcionais independentemente da célula (Neves *et al.*, 2008).

1.5.1. Ocorrência em doenças eosinofílicas

A ocorrência de grânulos no meio extracelular tem sido relatada no escarro de pacientes asmáticos desde o século XIX, mesmo antes do estabelecimento dos métodos de coloração para leucócitos por Paul Ehrlich e da identificação do eosinófilo. Estes grânulos eram chamados “grânulos lipídicos”, como revisado por Persson e Erjefalt (Dvorak *et al.*, 1976; Persson e Erjefalt, 1997b; a). No século seguinte, a lise

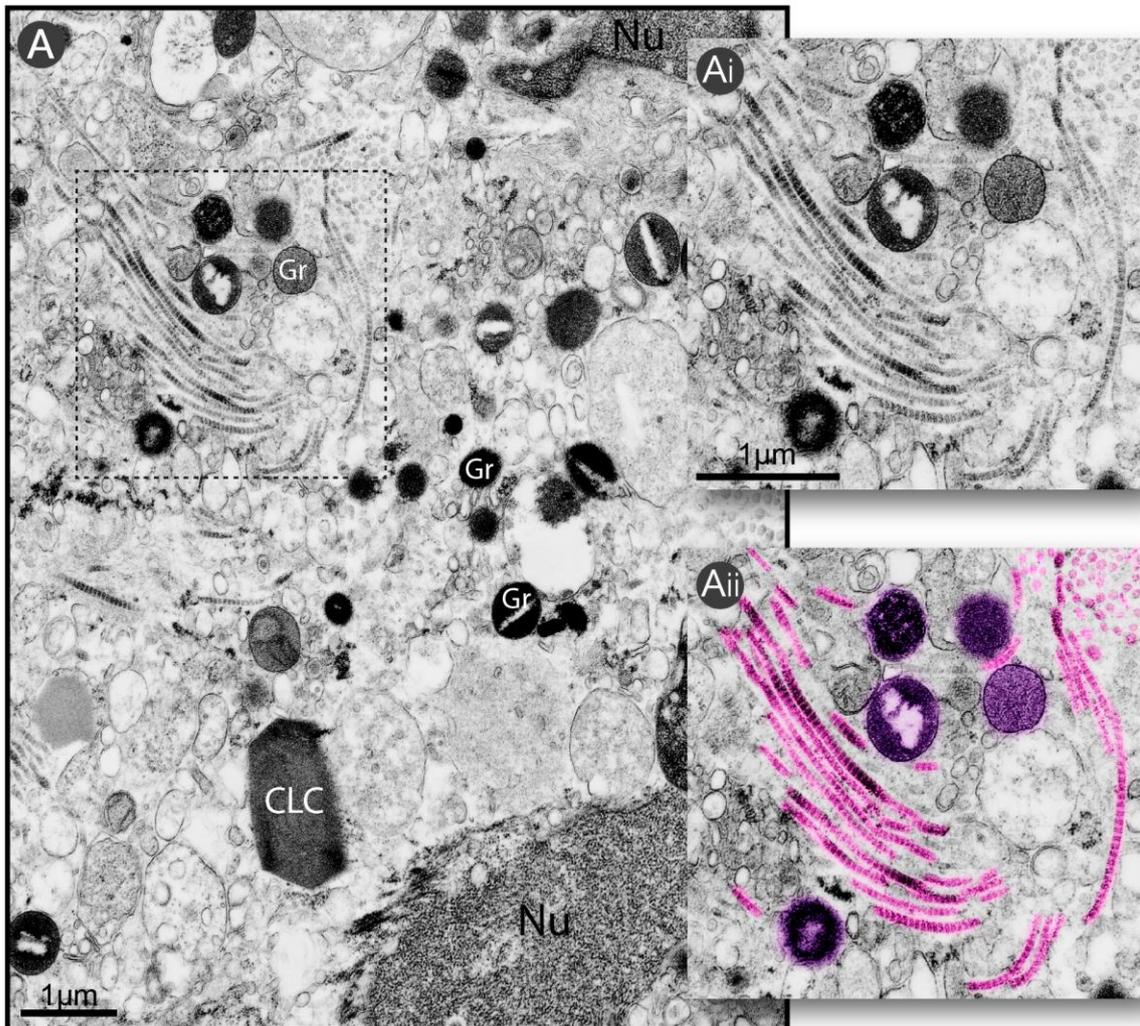


Figura 6 – Características ultraestruturais da citólise. MET da biópsia de uma lesão dérmica de um paciente com Síndrome Hipereosinofílica, mostrando um eosinófilo citolítico com grânulos (Gr) livres e intactos depositados no tecido, além de restos de conteúdo nuclear (Nu) e um cristal de Charcot-Leyden (CLC). **(A)** Maior aumento, evidenciando os grânulos livres (roxo em **Ai**) em meio aos feixes de colágeno (rosa em **Ai**) da matriz extracelular.

de eosinófilos e os FEGs continuaram sendo identificados em muitas condições, geralmente considerados apenas como um subproduto da necrose de eosinófilos. Foi apenas no final do século 20 que esse processo passou a não ser mais visto como um simples artefato, mas como um importante mecanismo de ativação de eosinófilos, considerado até como o estado de “ativação final” dos eosinófilos e como um possível alvo para futuros estudos farmacológicos sobre doenças eosinofílicas (Persson e Erjefalt, 1997b; a). Eosinófilos citolíticos com FEGs são frequentemente observados ao lado de células intactas, o que dá força à ideia de que essa morte não é resultado de necrose tecidual ou ruptura acidental dos eosinófilos (Erjefalt e Persson, 2000).

Ainda durante o século passado, mas especialmente nas últimas décadas, a citólise mostrou-se um evento frequente em inúmeras patologias relacionadas ao eosinófilo.

Além da asma (Jeffery *et al.*, 1992; Ohashi *et al.*, 1992), estudos morfológicos também mostraram a presença de eosinófilos citolíticos em pacientes com pólipos nasais (Erjefält *et al.*, 1998; Uller *et al.*, 2004; Armengot *et al.*, 2009), alergia a poeira (Watanabe *et al.*, 2003), pneumonia eosinofílica crônica (Gonzalez *et al.*, 1987), rinite alérgica (Erjefält *et al.*, 1998; Ahlstrom-Emanuelsson *et al.*, 2004), rinosinusite crônica (Ponikau *et al.*, 2005) e também em doenças não relacionadas às vias aéreas, como dermatite (Cheng *et al.*, 1997), erupções cutâneas de penfigoide bolhoso (Dvorak *et al.*, 1982), oncocercose (Gutiérrez-Peña *et al.*, 1998), hematomas subdurais crônicos (Yamashima *et al.*, 1985), síndrome nefrótica (Makino *et al.*, 1995), ceratoconjuntivite (Trocme *et al.*, 1989), esofagite eosinofílica (Aceves *et al.*, 2007; Saffari *et al.*, 2014), no trato gastrointestinal de pacientes com doença celíaca (Colombel *et al.*, 1992), doença de Crohn (Dubucquoi *et al.*, 1995; Rubio, 2003) e carcinoma gástrico avançado (Caruso *et al.*, 2005).

A citólise, em geral, é um dos mecanismos de ativação de eosinófilos mais comuns, identificado como o segundo mais frequente, ficando apenas atrás da PMD (Erjefält *et al.*, 2001). Um estudo em pacientes com rinite alérgica sazonal indicou a citólise como o principal mecanismo de liberação de produtos dos grânulos após a exposição a alérgenos (Erjefält *et al.*, 1999). Resultados semelhantes foram observados em pacientes com esofagite eosinofílica, onde a maioria dos eosinófilos (>70% das imagens analisadas) estavam em citólise (Saffari *et al.*, 2014). Curiosamente, a citólise é um processo de morte celular de eosinófilos muito mais frequente em condições inflamatórias do que a apoptose, como mostrado em biópsias de pólipos nasais (Erjefält *et al.*, 1998). Esse mecanismo pode explicar por que, em algumas situações, o aumento da deposição tecidual de proteínas dos grânulos de eosinófilos, como a MBP, nem sempre está associado ao maior acúmulo de destas células (Leiferman *et al.*, 1985; Wright *et al.*, 2011), já que essa secreção é causada por uma morte celular.

1.5.2. Grânulos livres e suas influências

Como os FEGs eram normalmente considerados artefatos, as suas possíveis ações fora da célula foram negligenciadas por décadas. Aqueles que defendiam a citólise como um estado de ativação dos eosinófilos comumente associavam a deposição de grânulos extracelulares a danos teciduais (Persson e Erjefalt, 1997a), ideia corroborada por diversos trabalhos. Um estudo em pacientes com pneumonia eosinofílica crônica demonstrou a proximidade entre aglomerados de grânulos de eosinófilos livres e locais sem células de revestimento alveolar e com membrana basal alveolar intacta mas reduzida (Gonzalez *et al.*, 1987). Na rinite alérgica, eosinófilos exibindo PMD extensiva e citólise se mostraram numerosos em áreas com alterações nas células epiteliais (Ahlstrom-Emanuelsson *et al.*, 2004). Uma análise de modelos de doença alérgica em porquinhos-da-índia identificou a presença de FEGs em áreas traqueais danificadas e também foi observada uma correlação significativa entre os FEGs e o grau de dano epitelial (Erjefält *et al.*, 1997). Chehade e cols. mostraram que nas biópsias endoscópicas de crianças com esofagite eosinofílica, a presença de aglomerados de FEGs, o que eles chamaram de "desgranulação de eosinófilos", eram mais comuns em crianças que apresentavam fibrose esofágica (Chehade *et al.*, 2007). Toyoda e cols. mostraram a correlação entre grânulos livres e a patologia da urticária (Toyoda *et al.*, 1996). Em pacientes com doença de Crohn, os eosinófilos citolíticos foram detectados apenas em áreas danificadas, não foi observada lise em áreas normais do intestino (Dubucquoi *et al.*, 1995). Um estudo ultraestrutural em biópsias renais de um paciente com síndrome nefrótica inferiu a presença de grânulos livres ao dano de células glomerulares (Makino *et al.*, 1995).

Além das condições já mencionadas, a citólise dos eosinófilos também desempenha um papel importante na asma, doença em que a influência desse mecanismo secretor é melhor descrita (Persson, 2014; Persson e Uller, 2014). Apresentando brevemente tais ações, estudos mostram um grande número de FEGs no escarro de pacientes com asma severa e que estes números são reduzidos após o tratamento da condição (Pizzichini *et al.*, 1997). Um estudo anterior relatou a presença de FEGs em espaços alargados entre células adjacentes e em regiões de abertura de junções de adesão entre células da mucosa brônquica em pacientes asmáticos (Ohashi *et al.*, 1992). Muniz-Junqueira e cols. demonstraram que a porcentagem de liberação de grânulos de eosinófilos é maior em crianças asmáticas

do que em crianças não asmáticas e que existe uma correlação direta entre a quantidade de grânulos encontrados no tecido e o grau de patogenicidade da asma (Muniz-Junqueira *et al.*, 2013). Em pacientes com asma leve eosinófilos estavam liberando pequenas quantidades de grânulos, enquanto em pacientes com asma grave quantidades moderadas de grânulos foram encontradas e, finalmente, em pacientes com asma severa, grandes quantidades de grânulos estavam depositadas nos tecidos (Muniz-Junqueira *et al.*, 2013).

Todos esses trabalhos corroboram com a ideia de que a citólise de eosinófilos com liberação de grânulos extracelulares está intimamente associada à lesão tecidual e à patogenicidade da doença. Em conjunto e dada a presença da citólise de eosinófilos em inúmeras patologias, é de extrema importância o estudo deste mecanismo para o melhor entendimento das doenças relacionadas com os eosinófilos.

1.5.3. Grânulos como organelas secretoras independentes da célula

Apesar da correlação entre eosinófilos citolíticos e diversas doenças, durante muito tempo, nada se sabia sobre os mecanismos pelos quais os grânulos livres poderiam exercer seus efeitos. Existem estudos ultraestruturais demonstrando que alguns grânulos livres se encontram degenerados nos tecidos (Gonzalez *et al.*, 1987; Gutiérrez-Peña *et al.*, 1998), o que indicaria um possível mecanismo de liberação do conteúdo. No entanto, a frequência dessas observações não foi estabelecida e a maioria dos trabalhos sobre citólise de eosinófilos nem mesmo relatam degeneração de grânulos livres, indicando que este é provavelmente um evento sutil, portanto, não explicaria por si só o efeito causado pelos FEGs. Colombel e cols. detectaram, por imunomarcção ultraestrutural, MBP extracelular em estreita associação com grânulos livres, mas a origem desta MBP não pôde ser confirmada (Colombel *et al.*, 1992).

Em 2008, Neves e cols. demonstraram pela primeira vez que os grânulos de eosinófilos são organelas secretoras ativas e independentes, ou seja, podem secretar conteúdos mesmo fora da célula (Neves *et al.*, 2008). Este estudo mostra que grânulos de eosinófilos isolados possuem os receptores de membrana atipos para IFN- γ e

CCL11, secretando ECP e β -hexaminidase após estimulação com estes agonistas inflamatórios. O IFN- γ também foi capaz de induzir a secreção das citocinas IL-4 e IL-6. Um fato interessante é que, mediando a secreção de grânulos livres de eosinófilos, existe uma complexa via de sinalização intragranular. Os inibidores de tirosina quinase, proteína quinase C (PKC - *protein kinase C*) e proteína quinase ativada por mitógenos p38 (p38 MAPK - *mitogen-activated protein kinase*) inibiram a liberação de ECP induzida por IFN- γ , enquanto a liberação de ECP induzida por eotaxina foi reprimida por inibidores de fosfoinosítido 3-quinase (PI3K - *phosphoinositide 3-kinase*) e também por inibidores de p38 MAPK e PKC (Neves *et al.*, 2008). Outro componente capaz de inibir a secreção de grânulos isolados foi a BFA (Neves *et al.*, 2008). O tratamento com esse composto também levou ao acúmulo de depósitos intragranulares de lipídios, o que poderia indicar um papel destes compartimentos e do transporte vesicular nessa secreção. No entanto, até o momento não existem evidências observacionais do brotamento de vesículas a partir de grânulos livres.

Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que os grânulos de eosinófilos também apresentam receptores de leucotrienos cisteínicos (cysLT - *cysteinyl leukotrienes*) - cysLT1R e cysLT2R - e o receptor purinérgico P2Y12 (Neves *et al.*, 2010). Além disso, LTC₄, LTD₄ e LTE₄ foram capazes de estimular a secreção de ECP de grânulos isolados. Nenhuma secreção de citocina foi induzida por qualquer um dos cysLT usados no estudo, indicando uma especificidade de secreção de ECP (Neves *et al.*, 2010). Por outro lado, os grânulos livres parecem carecer de outros receptores típicos de membrana celular de eosinófilos como os receptores para GM-CSF, IL-5, IL-3- β e C5a (Muniz *et al.*, 2012). Isso poderia representar ações distintas entre FEGs e eosinófilos intactos, visto que seu repertório de receptores não é o mesmo (Muniz *et al.*, 2012). E também, explicam, em parte, a falha da terapia anti-IL-5 no tratamento de alguns pacientes asmáticos, uma vez que essa terapia teria como alvo apenas os eosinófilos intactos e não seus grânulos livres (Muniz *et al.*, 2012).

Esses achados são cruciais para a compreensão da imunobiologia dos eosinófilos. Eles nos mostram que os grânulos secretores são organelas extremamente dinâmicas e complexas que podem funcionar independentemente da célula. Estes grânulos, abrigam receptores ativos em suas membranas que são capazes de desencadear modificações bioquímicas que levarão à secreção de mediadores nos tecidos onde estão depositados.

1.6. Citólise: muito além da deposição de grânulos

A citólise de eosinófilos e sua ocorrência em doenças, conforme ressaltado acima, são eventos comumente associados à deposição de grânulos livres nos tecidos (Spencer *et al.*, 2014). Porém, estudos recentes vêm mostrando que outras estruturas derivadas da citólise de eosinófilos, particularmente armadilhas de DNA, cristais de Charcot Leyden (CLCs) e EoSVs podem também estar envolvidas nesse mecanismo de ativação do eosinófilo (Ueki *et al.*, 2013; Saffari *et al.*, 2014; Ueki *et al.*, 2018).

1.6.1. ETose

Em 2004, Brinkmann e cols. descreveram um novo mecanismo pelo qual neutrófilos matavam microrganismos, que consistia na formação do que chamaram de “armadilhas extracelulares de neutrófilos” (NETs – *neutrophil extracellular traps*), compostas principalmente de DNA embebido em proteínas típicas dos grânulos de neutrófilos (Brinkmann *et al.*, 2004). Alguns anos depois, foi demonstrado que essa liberação de NETs é resultado de um novo tipo de mecanismo de morte celular, no qual a membrana plasmática e o envelope nuclear se dissolvem possibilitando o extravasamento de DNA (Fuchs *et al.*, 2007). Pouco mais tarde, os mesmos resultados foram observados em mastócitos, um mecanismo de morte celular acompanhado pela liberação de armadilhas extracelulares (ETs – *extracellular traps*) com atividade antimicrobiana (Von Köckritz-Blickwede *et al.*, 2008). Esse processo de morte celular seguido pela liberação de ETs foi então denominado ETose (Wartha e Henriques-Normark, 2008). Alguns autores usam o termo NETose (*neutrophil ETosis*) quando se referem especificamente ao processo em neutrófilos. No entanto, foi posteriormente mostrado que a liberação de redes extracelulares de DNA não necessariamente ocorre juntamente à morte celular (Yousefi *et al.*, 2009). Essa liberação de ETs a manutenção da viabilidade celular é comumente chamada de ETose vital, e aqui o DNA extracelular é descrito como sendo de origem mitocondrial (Yousefi *et al.*, 2009).

Para eosinófilos, os primeiros relatos sobre a liberação de ETs defendem que estas possuem origem mitocondrial e são liberadas com ausência de morte celular, com os eosinófilos permanecendo viáveis mesmo após esse processo (Yousefi *et al.*,

2008). O DNA mitocondrial extracelular foi mostrado como sendo “catapultado” a partir dos eosinófilos e capaz de causar danos a microrganismos, por se encontrar incorporado em proteínas dos grânulos específicos, como ECP e MBP (Yousefi *et al.*, 2008).

Posteriormente, foi demonstrado que a liberação de ETs de eosinófilos (EETs – *eosinophil extracellular traps*) também ocorre em associação com a morte celular citolítica, por um mecanismo diferente da apoptose ou da necrose clássica (Figura 7) (Ueki *et al.*, 2013). Essa morte pôde ser desencadeada pela estimulação com PAF + IL-5 ou GM-CSF, PMA, IgG, IgA ou ionóforo de cálcio A23187 (Ueki *et al.*, 2013). Importante ressaltar que esses três últimos estímulos eram classicamente conhecidos como indutores de citólise (Fukuda *et al.*, 1985; Weiler *et al.*, 1996). Na ETose do eosinófilo (EETose – *eosinophil ETosis*), a origem do DNA das armadilhas é nuclear e apresenta algumas distinções importantes da NETose. (Ueki *et al.*, 2013). Na NETose, produtos dos grânulos de neutrófilos são incorporados às armadilhas de DNA e, de fato, a translocação desses produtos, como a mieloperoxidase (MPO) e elastase de neutrófilos (NE) para o núcleo é um evento precoce na NETose e possivelmente essencial para o desencadeamento deste tipo de morte celular (Fuchs *et al.*, 2007; Papayannopoulos *et al.*, 2010; Metzler *et al.*, 2014). O mesmo não acontece com a EETose, a qual se caracteriza pela presença de grânulos intactos, completamente funcionais e presos às armadilhas de DNA dos eosinófilos (Figura 7) (Ueki *et al.*, 2013). Por conta dessa diferença, as EETs derivadas da EETose são mais estáveis do que as NETs. As enzimas proteolíticas incorporadas nas NETs se degradam mais rapidamente, enquanto o mesmo não acontece em EETs, uma vez que as proteínas do eosinófilo permanecem armazenadas dentro de FEGs (Ueki *et al.*, 2016).

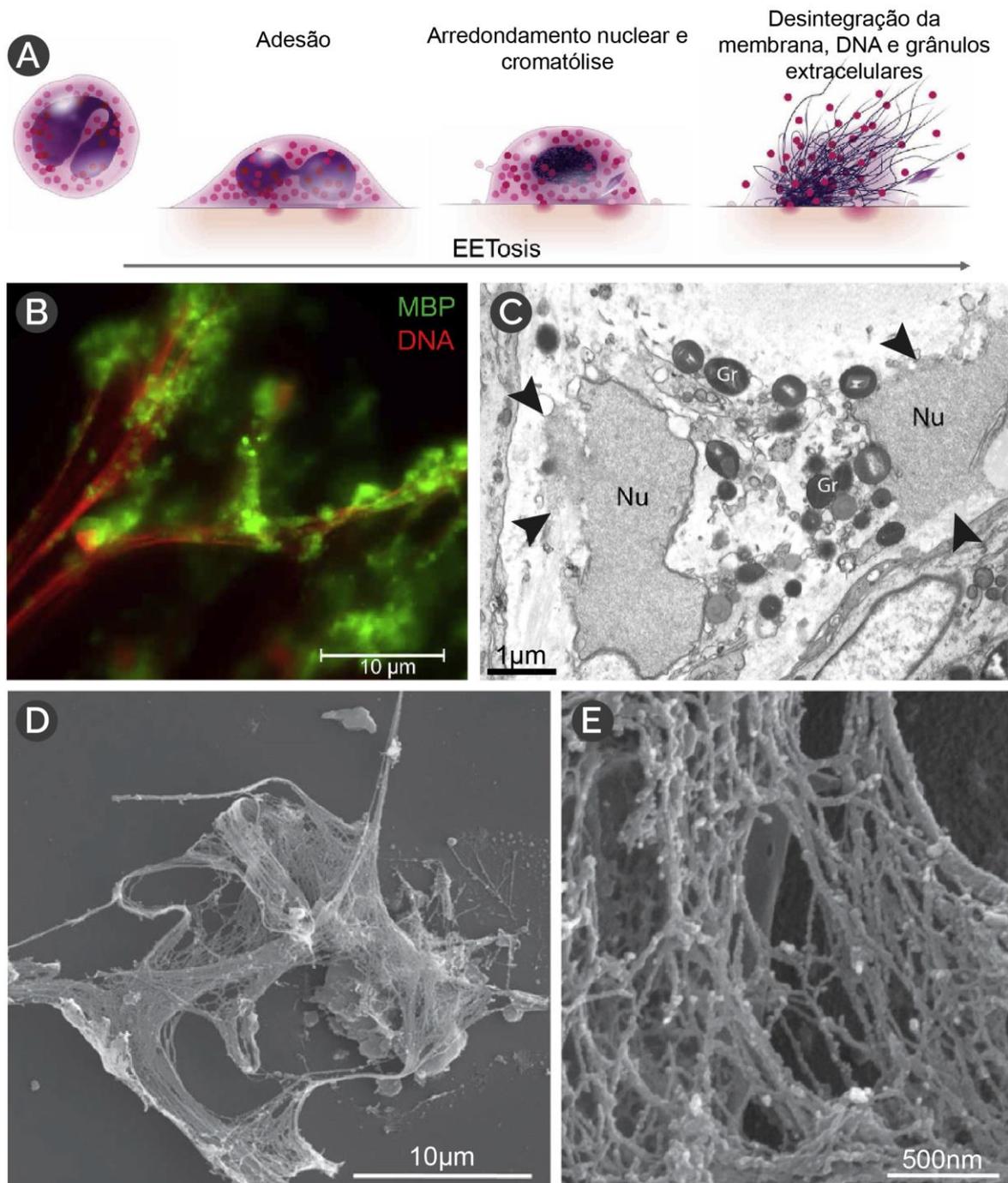


Figura 7 – ETose do eosinófilo. (A) Ilustração da sequência de eventos que ocorrem no processo de ETose do eosinófilo. (B) Imunofluorescência de eosinófilos em ETose estimulados com A23187 marcados DNA e MBP. (C) MET da biópsia de um paciente com síndrome hipereosinofílica onde se pode observar grânulos livres (Gr) e núcleo rompido (Nu), com cabeças de seta indicando regiões de extravasamento de conteúdo nuclear. (D e E) Microscopia eletrônica de varredura de eosinófilos estimulados com fator ativador de plaquetas, mostrando grandes redes de DNA liberadas pelos eosinófilos. (A e B) Adaptados de Fukushi *et al.* 2021. (C-E) Adaptadas de Ueki *et al.* 2013.

Apesar da ETose em neutrófilos ter uma forte ação antimicrobiana, em eosinófilos a função deste mecanismo ainda é pouco entendida. As armadilhas derivadas da morte do eosinófilo têm um forte potencial na captura de bactérias (*S. aureus* e *E. coli*) e fungos microscópicos (*C. albicans* e *Aspergillus sp.*) (Ueki *et al.*, 2016). No entanto, um estudo com *Aspergillus fumigatus* demonstrou que apesar do fungo se aderir as ETs do eosinófilo, elas foram incapazes de induzir qualquer alteração funcional ao microrganismo (Muniz *et al.*, 2018). Ao contrário de ter ações protetivas, hipóteses apontam que as EETs podem prender conídios de *A. fumigatus* na árvore brônquica, o que poderia causar uma colonização crônica e propagação da inflamação (Silva *et al.*, 2021).

A ocorrência da ETose de eosinófilos já foi descrita em diversas doenças humanas tais como asma (Mukherjee *et al.*, 2018; De Groot *et al.*, 2019), Rinossinusite crônica eosinofílica (RSCE) (Ueki *et al.*, 2016; Persson *et al.*, 2019), aspergilose broncopulmonar alérgica (Muniz *et al.*, 2018; Omokawa *et al.*, 2018), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Echevarría *et al.*, 2017), otite média eosinofílica (Ohta *et al.*, 2018), síndrome hipereosinofílica (Ueki *et al.*, 2013; Takeda *et al.*, 2020) e na aterotrombose (Pertiwi *et al.*, 2019). Na DPOC, a ocorrência de EETose foi associada a maior dano celular, possivelmente relacionado a um aumento da inflamação estéril com recrutamento de neutrófilos e NETose (Echevarría *et al.*, 2017). O DNA de células que estão morrendo pode servir como padrões moleculares associados a danos (DAMPs – *Damage Associated Molecular Patterns*) (Marichal *et al.*, 2011), então, de fato, os filamentos de DNA liberados pela EETose podem ter efeitos no aumento da inflamação. Já se sabe que DNA extracelular possui a capacidade de influenciar a viscosidade do muco (Rogers, 2007).

As armadilhas de DNA derivadas da ETosis do eosinófilo são capazes de levar a um aumento da viscosidade do muco de secreções eosinofílicas (Ueki *et al.*, 2016; Ueki *et al.*, 2018) e este aumento pode influenciar o prognóstico de diversas doenças. Como visto em um paciente diagnosticado com aspergilose broncopulmonar alérgica, onde o tratamento com corticosteroide diminuiu as concentrações das armadilhas de DNA e a obstrução pelo muco, o que levou a uma melhora clínica do quadro (Omokawa *et al.*, 2018). Além disso, como já discutido, os FEGs causam danos aos tecidos e são capazes de prolongar a resposta dos eosinófilos após a morte celular. Como esses grânulos também são liberados no meio extracelular em consequência

da EETose e retêm suas capacidades secretoras (Ueki *et al.*, 2013), eles possivelmente possuem as mesmas ações danosas já mencionadas anteriormente para inúmeras condições.

1.6.2. Cristais de Charcot-Leyden

Outros importantes atores na resposta desencadeada pela morte citolítica do eosinófilo são os Cristais de Charcot-Leyden (CLCs – *Charcot-Leyden Crystals*). CLCs são delgados cristais hexagonais bipiramidais (Figura 8A) descritos pela primeira vez em meados do século XIX e são considerados uma marca registrada da inflamação eosinofílica (Su, 2018). Os CLCs são formados pela cristalização da proteína galectina-10, uma proteína de ligação a carboidratos (Leonidas *et al.*, 1995). Apesar dos CLCs terem sido descritos, durante mais de um século, em variadas doenças infecciosas e alérgicas, além de diversos tipos de tumores e de outras condições inflamatórias, pouca atenção foi dada a cerca de seu mecanismo de formação e funcionalidade (Su, 2018; Ueki *et al.*, 2019). A lise de eosinófilos induzida por aerossóis já era um método utilizado para a obtenção destes cristais (Ayres, 1949; El-Hashimi, 1971), no entanto, apenas mais recentemente, no ano de 2018, que este mecanismo foi melhor descrito (Ueki *et al.*, 2018). *In vitro*, após a estimulação para EETose e durante as alterações morfológicas relacionadas a este mecanismo de morte celular, a proteína galectina-10, que se encontra abundantemente localizada no citoplasma periférico (Melo *et al.*, 2020), começa uma realocação citoplasmática e se inicia o processo de cristalização, que acontece imediatamente após o dano à membrana plasmática (Figura 8B) (Ueki *et al.*, 2018).

Em doenças humanas, o aumento das concentrações de galectina-10 e a presença de CLCs está associada a dano tecidual e ao grau de inflamação (De Re *et al.*, 2009; Khrizman *et al.*, 2010; Ueki *et al.*, 2018). Inclusive, a detecção desta proteína vem se mostrando útil em diagnósticos clínicos (Liu *et al.*, 2019), para a previsão da resposta do paciente à glicocorticoides (Wu *et al.*, 2019) e na diferenciação de condições eosinofílicas e não-eosinofílicas (Nyenhuis *et al.*, 2019). Em suas ações inflamatórias, CLCs são capazes de induzir a secreção de IL-1 β e a ativação de inflamassomas (Persson *et al.*, 2019; Rodríguez-Alcázar *et al.*, 2019). Também estão muito relacionados com o recrutamento de neutrófilos (Rodríguez-Alcázar *et al.*, 2019;

Gevaert *et al.*, 2020), sendo capazes ainda de induzir a NETose destas células (Gevaert *et al.*, 2020).

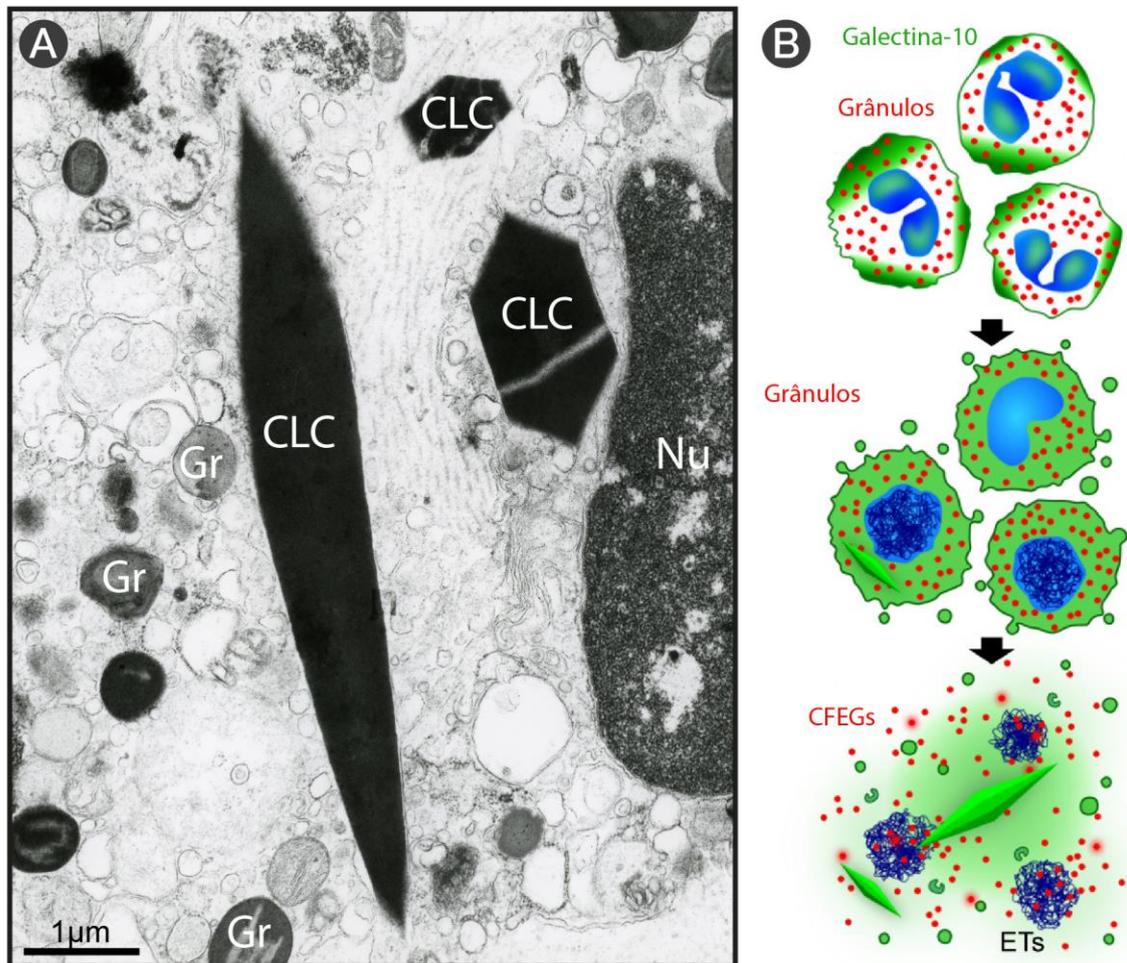


Figura 8 – Cristais de Charcot-Leyden (CLCs). (A) MET do sino nasal de um paciente com sinusite crônica, mostrando um eosinófilo citolítico com CLCs em evidência. (Gr) Grânulos livres, (Nu) conteúdo nuclear. (B) Processo de formação dos CLCs durante a EETose dos eosinófilos. (A) Adaptada de Melo *et al.* 2020. (B) Adaptada de Ueki *et al.* 2018.

1.6.3. Vesículas derivadas da citólise

Durante a indução da EETose foi mostrado que eosinófilos realizam a liberação de vesículas extracelulares carregadas com a proteína galectina-10 (Ueki *et al.*, 2018). Além disso, a presença de outra população distinta de vesículas foi identificada durante a morte citolítica do eosinófilo, as EoSVs, vesículas típicas do transporte intracelular de produtos dos grânulos, discutidas na seção 1.4.1. Em um estudo ultraestrutural em pacientes com esofagite eosinofílica, a citólise foi mostrada como um mecanismo secretor do eosinófilo muito frequente (Saffari *et al.*, 2014). Neste mesmo trabalho, foi relatada a presença de EoSVs livres no tecido, juntamente com os grânulos secretores do eosinófilo (Figura 9). No entanto, pouca atenção foi dada a esta observação. Nosso grupo vem trabalhando com biópsias de pacientes com diferentes condições inflamatórias e também realizamos observações similares (Ueki *et al.*, 2018). Se estes são apenas fatos isolados, ou se a liberação destas vesículas é um fenômeno recorrente na citólise do eosinófilo, ainda é uma questão em aberto.

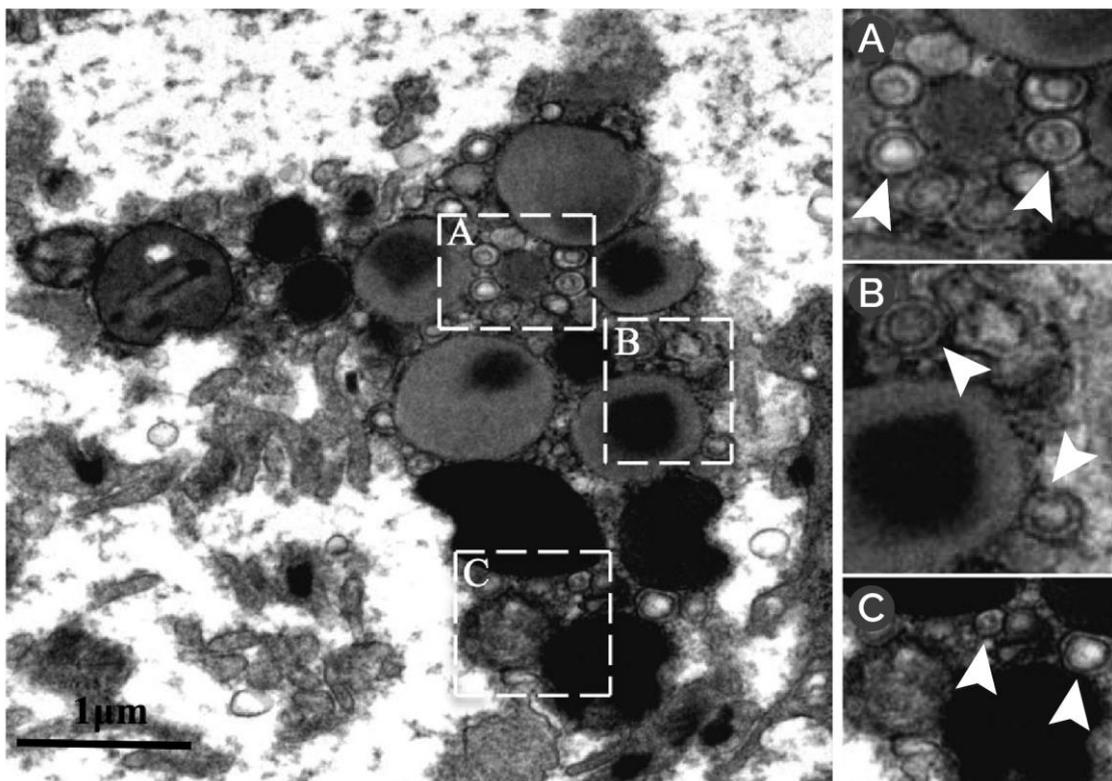


Figura 9 – Presença de EoSVs após a citólise. Eosinófilo citolítico em uma biópsia de esofagite eosinofílica, (A-C) mostrando EoSVs (cabeças de seta) juntamente com os grânulos livres. Adaptada de Saffari *et al.* 2014.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a importância da citólise em doenças eosinofílicas, é fundamental compreender os mecanismos pelos quais o eosinófilo propaga sua resposta mesmo após a morte celular. A citólise do eosinófilo é um mecanismo complexo e gerador de organelas e estruturas que podem permanecer nos tecidos com potencial implicação funcional.

A MET é uma técnica muito utilizada para o estudo dos mecanismos secretores do eosinófilo, pois é a única que permite distinguir em alta resolução as formas de desgranulação dessa célula (Melo *et al.*, 2010b). Além disso, a MET é fundamental para a análise de estruturas subcelulares, em especial para eosinófilos, que possuem uma população de vesículas específicas (EoSvs), identificadas apenas por esta técnica. Enquanto a microscopia eletrônica de varredura é a técnica mais classicamente aplicada para estudos de ETose de leucócitos *in vitro*, incluindo neutrófilos e eosinófilos, a “assinatura ultraestrutural” da ETose de eosinófilos por MET *in vivo* ainda é muito pouco conhecida. Desta forma, o presente trabalho pretende estudar em detalhes o processo de citólise de eosinófilos sob o ponto de vista ultraestrutural em dois tipos de doenças eosinofílicas humanas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Investigar, *in situ*, as características ultraestruturais de eosinófilos em processo de citólise em doenças inflamatórias eosinofílicas humanas.

3.2. Objetivos específicos

Identificar os processos de desgranulação de eosinófilos em infiltrados inflamatórios da colite ulcerativa e rinosinusite crônica eosinofílica;

Investigar as alterações ultraestruturais nos eosinófilos em processo citolítico, incluindo características de ETose;

Descrever a assinatura ultraestrutural da ETose de eosinófilos *in vivo*;

Avaliar a distribuição e integridade de EoSVs livres na matriz extracelular após a morte de eosinófilos.

4. METODOLOGIA

4.1. Pacientes e biópsias

Biópsias do íleo e/ou do reto foram obtidas durante o processo de proctocolectomia de pacientes que sofriam de colite ulcerativa (n = 15 pacientes). Também foram coletados o tecido dos seios intranasais de pacientes diagnosticados com rinosinusite crônica eosinofílica (RSCE) (n = 2 pacientes). Essas doenças são consideradas tipicamente como patologias eosinofílicas (Carvalho *et al.*, 2003; Lampinen *et al.*, 2008; Kennedy e Borish, 2013), onde a citólise do eosinófilo já foi anteriormente relatada (Erjefalt *et al.*, 2001; Ponikau *et al.*, 2005). Após coleta, todas as amostras foram imediatamente fixadas e preparadas para MET como descrito no item 3.2. Todas as biópsias usadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela Profa. Ann Dvorak (Harvard Medical School, Boston, MA, EUA), com aprovação prévia do comitê de ética do Hospital Beth Israel Deaconess Medical Center (CCI/BIDMC).

4.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Todas as amostras (n = 15 fragmentos para colite ulcerativa e 2 fragmentos para RSCE) foram fixadas em 2,0% de paraformaldeído, 2,5% de glutaraldeído e 0,025% de CaCl₂ em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, e preparados para MET, conforme descrito anteriormente (Carmo *et al.*, 2016). As amostras foram pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio em tampão, pH 7,4, durante 2h à temperatura ambiente. Após lavagem com tampão maleato de sódio, pH 5,2, foram corados *en bloc* em 2% de acetato de uranila em 0,05M de tampão de maleato de sódio, pH 6,0, durante 2h à temperatura ambiente e lavados no mesmo tampão antes da desidratação em álcoois graduados e infiltração e incorporação com uma sequência de óxido de propileno-Epon (Resina *Eponate* 12; Ted Pella, Redding, CA, EUA). Após polimerização a 60°C

durante 16h, secções ultrafinas foram cortadas usando uma faca de diamante sobre um ultramicrotomo (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, EUA). As secções foram montadas em telas de cobre 200 *mesh* (Ted Pella), contrastadas com citrato de chumbo a 5% e analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2-12, FEI/Thermo Fisher Scientific, 80 kV; e P300, Philips, 60 kV).

4.3. Análises ultraestruturais

Um total de 212 micrografias eletrônicas (n= 81 micrografias para colite ulcerativa e 131 micrografias para RSCE) de áreas teciduais contendo eosinófilos íntegros e/ou em processo de citólise, em diferentes aumentos, foram obtidas ao acaso. Pelo menos, dois blocos de tecidos de cada amostra foram analisados tanto qualitativa quanto quantitativamente. Para fins de quantificação de diferentes parâmetros, conforme abaixo, as áreas teciduais foram medidas usando o Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). No total analisou-se uma área de 31.300 μm^2 de área tecidual (17.000 μm^2 e 14.300 μm^2 , colite e RSCE respectivamente).

4.3.1. Avaliação dos processos de desgranulação

Primeiramente, os eosinófilos foram classificados quanto à ocorrência ou não de processos de desgranulação, de acordo com os seguintes critérios: i) íntegros em repouso (células com membrana plasmática intacta, com ausência de alterações nucleares e sem eventos de desgranulação); ii) íntegros em PMD (células com membrana plasmática intacta, com ausência de alterações nucleares e com evidências morfológicas típicas de PMD, representada por grânulos com perda de elétron-densidade do cristalóide e/ou da matriz, desorganização do cristalóide e presença de EoSVs no citoplasma); iii) íntegros em processo de exocitose (com presença de eventos de fusão entre grânulos e/ou entre grânulos com a membrana plasmática); iv) em processo de citólise inicial (rompimento parcial da membrana plasmática, com ausência ou pouco extravasamento do conteúdo citoplasmático); v) em processo de citólise tardia (rompimento total da membrana plasmática,

extravasamento do conteúdo citoplasmático e deposição de grânulos intactos na matriz extracelular). As proporções dos processos descritos acima foram estabelecidas.

4.3.2. Análise qualitativa e quantitativa dos aspectos nucleares

Para identificação de alterações nucleares indicativas de ETose, a ultraestrutura nuclear foi analisada em detalhes em todos os eosinófilos encontrados em processos de citólise ou não, tanto nas biópsias intestinais como nas de tecido nasal. As seguintes características ultraestruturais foram investigadas, e quantificadas: i) padrão de condensação/descondensação da cromatina; ii) integridade da membrana nuclear; e iii) grau de expansão da cromatina. No total, 149 núcleos ou conteúdos nucleares de eosinófilos foram analisados (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de conteúdos nucleares e de suas características ultraestruturais estudadas nas biópsias.

Característica do conteúdo nuclear	Número de conteúdos nucleares		
	Colite ulcerativa	RSCE	Total
Total	76	73	149
Núcleos normais de eosinófilos intactos	38	42	80
Núcleos de eosinófilos em citólise	38	31	69
Núcleos de eosinófilos em citólise com distinção entre eu- e heterocromatina	17	23	40
Envoltório não rompido	13	14	27
Envoltório rompido ou ausente	4	9	13
Núcleos de eosinófilos em citólise com cromatina totalmente descondensada	14	15	29
Envoltório não rompido	7	6	13
Envoltório rompido ou ausente	7	9	16

Para verificarmos o grau de expansão da cromatina, medimos a área do núcleo normal de eosinófilos intactos (n = 80), de núcleos de eosinófilos em citólise que apresentavam a cromatina totalmente descondensada (n = 13) e aqueles de eosinófilos em citólise que não apresentaram esta característica ultraestrutural da cromatina (n = 27), considerando apenas os núcleos com envoltório não rompido.

Calculamos a proporção de núcleos apresentando alterações do envoltório nuclear (descolamento e vesiculação), novamente considerando apenas aqueles núcleos com envoltório não rompido. Medimos a área e diâmetro de vesículas associadas ao envoltório nuclear.

4.3.3. *Análise qualitativa e quantitativa de EoSVs*

EoSVs foram quantificadas nas seguintes situações, conforme definido no item 3.3.1: i) dentro do citoplasma, em eosinófilos íntegros; ii) em associação com eosinófilos em processo de citólise inicial; iii) em associação com eosinófilos em processo de citólise tardia.

Para análises de integridade de EoSVs no decorrer da citólise, as quantificações de EoSVs foram feitas levando em conta áreas teciduais contendo eosinófilos ou grânulos de eosinófilos livres (no mínimo cinco grânulos). Consideramos áreas de aproximadamente $180\mu\text{m}^2$, equivalentes à área de um aumento de 6800x. Esta contagem por área é necessária, pois existe a possibilidade de haver mais de um eosinófilo citolítico em uma mesma região, desta forma não poderíamos determinar de qual dos eosinófilos uma vesícula específica seria derivada. Considerando estes critérios, 89 áreas teciduais foram analisadas. Destas, 45 foram da colite ulcerativa (20 contendo eosinófilos intactos, 11 com citólise inicial e 14 com a citólise tardia) e 44 da RSCE (18 contendo eosinófilos intactos, 11 com citólise inicial e 15 com a citólise tardia) (Tabela 2). Então, todas as EoSVs presentes nestas áreas foram contadas ($n = 1.586$ EoSVs; 800 da colite e 786 da RSCE) e separadas em três grupos com base na classificação descrita: i) EoSVs no interior de eosinófilos intactos; ii) EoSVs no interior ou próximas (máx. $1\mu\text{m}$ de distância) de eosinófilos em citólise inicial; iii) EoSVs livres, ou seja, derivadas de eosinófilos em citólise tardia. Desta forma pudemos comparar a densidade populacional de EoSVs ($\text{EoSVs}/\mu\text{m}^2$) presentes entre cada um destes estágios e identificar se a citólise acarreta ou não em uma perda significativa destas vesículas.

Tabela 2 – Número de micrografias para análise quantitativa da integridade de EoSVs

Estágio do eosinófilo	Número de micrografias	
	Colite ulcerativa	RSCE
Íntegro	20	18
Citólise inicial	11	11
Citólise tardia	14	15
Total	45	44

Para avaliação da distribuição tecidual, as proporções de EoSVs livres (n = 621; 278 da colite e 343 da RSCE), próximas a estruturas da matriz extracelular (FEGs, colágeno, células e depósitos de cromatina) foi calculada. Considerando proximidade como uma distância menor que 1µm e EoSVs livres como aquelas pertencentes a eosinófilos em citólise tardia. Aqui, consideramos todas as EoSVs livres encontradas no tecido, desconsiderando as limitações impostas de área na análise quantitativa anterior.

4.4. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em porcentagem (%) ou como média ± EPM, estes últimos foram analisados segundo o teste de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações com nível de significância $P < 0,05$. As análises estatísticas foram feitas com auxílio do software *GraphPad Prism* versão 6.01.

5. RESULTADOS

5.1. PMD e citólise são os mecanismos mais frequentes de desgranulação de eosinófilo na colite ulcerativa e RSCE

Primeiramente, pudemos perceber pela MET a infiltração de eosinófilos nos sítios inflamatórios das biópsias de ambas as patologias estudadas. A partir daí, quisemos verificar a ativação do eosinófilo nesses tecidos, avaliando os mecanismos de secreção pelos quais os eosinófilos estavam liberando o conteúdo de seus grânulos. Nas duas doenças, todos os eosinófilos observados mostravam evidências morfológicas de desgranulação. Na colite ulcerativa, todos os três mecanismos de secreção do eosinófilo foram observados; PMD, exocitose e citólise (Figuras 10A e B), enquanto na RSCE, apenas PMD e citólise foram identificadas (Figura 10C).

A citólise foi o mecanismo de secreção mais frequente na colite ulcerativa, representando 49,9% dos eosinófilos, seguida pela PMD (41,8%) e pela exocitose em menor proporção (8,8%) (Figura 10D). Na RSCE, a PMD foi mais frequente que a citólise (52,5% e 47,5% respectivamente), mas apresentaram apenas uma pequena diferença em si (Figura 10E).

Tendo estabelecido os mecanismos de desgranulação e identificado a citólise como um importante mecanismo secretor do eosinófilo *in vivo*, em seguida, esse processo foi avaliado em maiores detalhes. Quando observamos os eosinófilos citolíticos nos tecidos pudemos perceber a presença de diversos estágios de progressão da citólise, que classificamos em duas fases (conforme descrito em material e métodos): “citólise inicial” (Figura 11A) e “citólise tardia” (Figura 11B). Junto a este último estágio a presença de CLCs no tecido foi frequente. A proporção de eosinófilos apresentando cada um destes estágios de progressão da citólise é muito parecida nas duas doenças estudadas (Figuras 11C e D), com aproximadamente 30% em citólise inicial e 70% em citólise tardia.

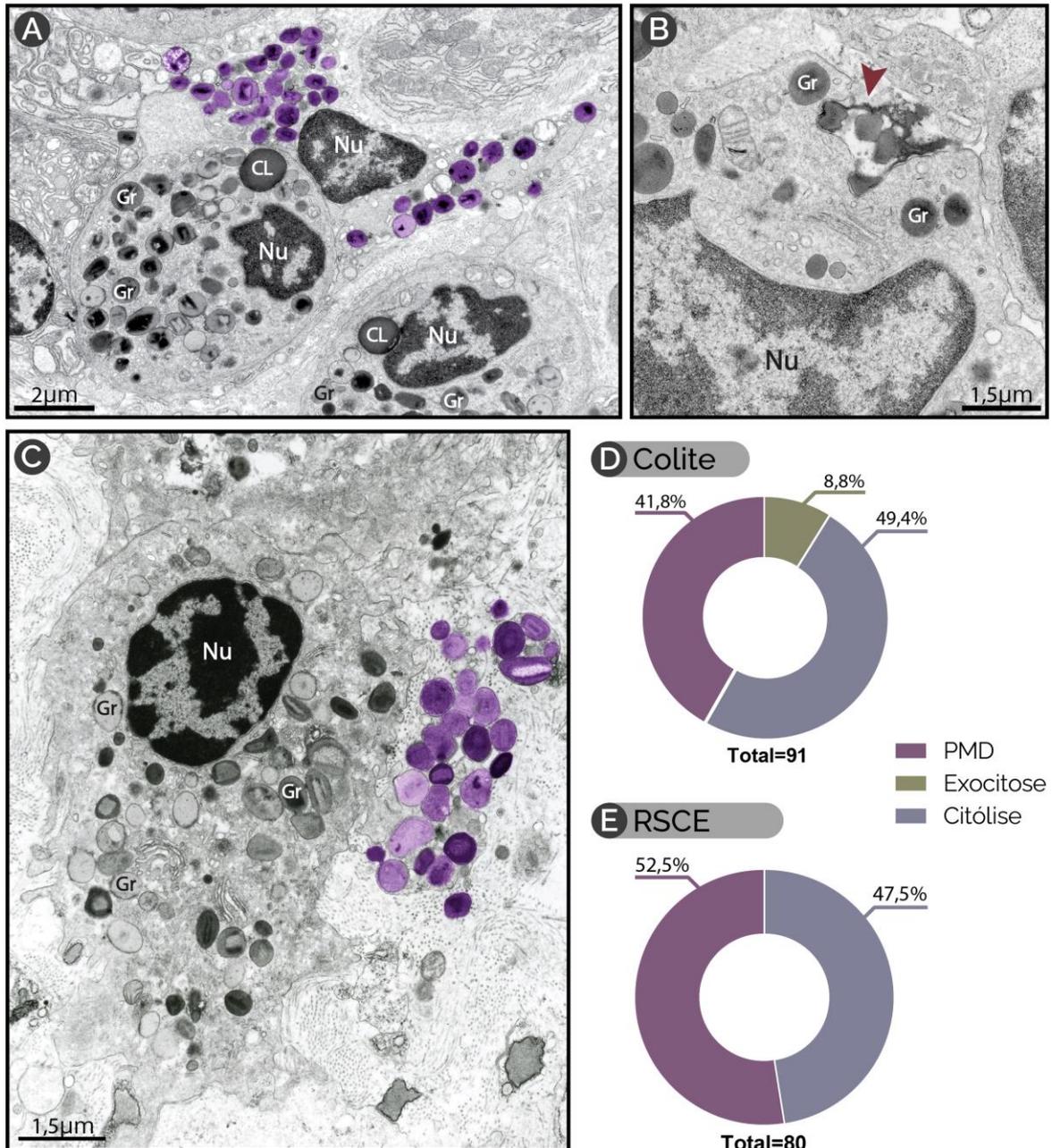


Figura 10 – Mecanismos secretores de eosinófilos teciduais em doenças eosinofílicas. (A) Eosinófilos em PMD, na colite ulcerativa, próximos de um eosinófilo em processo de citólise, com grânulos destacados em roxo. **(B)** Secção de um eosinófilo em exocitose na colite ulcerativa, com fusão de grânulos com a membrana plasmática (cabeça de seta). **(C)** RSCE. Eosinófilo em PMD e grânulos livres (roxo) derivados de um eosinófilo citolítico. **(D e E)** Proporção de mecanismos secretores apresentados por eosinófilos na colite ulcerativa e sinusite. Nu: núcleo; Gr: grânulo; CL: corpúsculo lipídico.

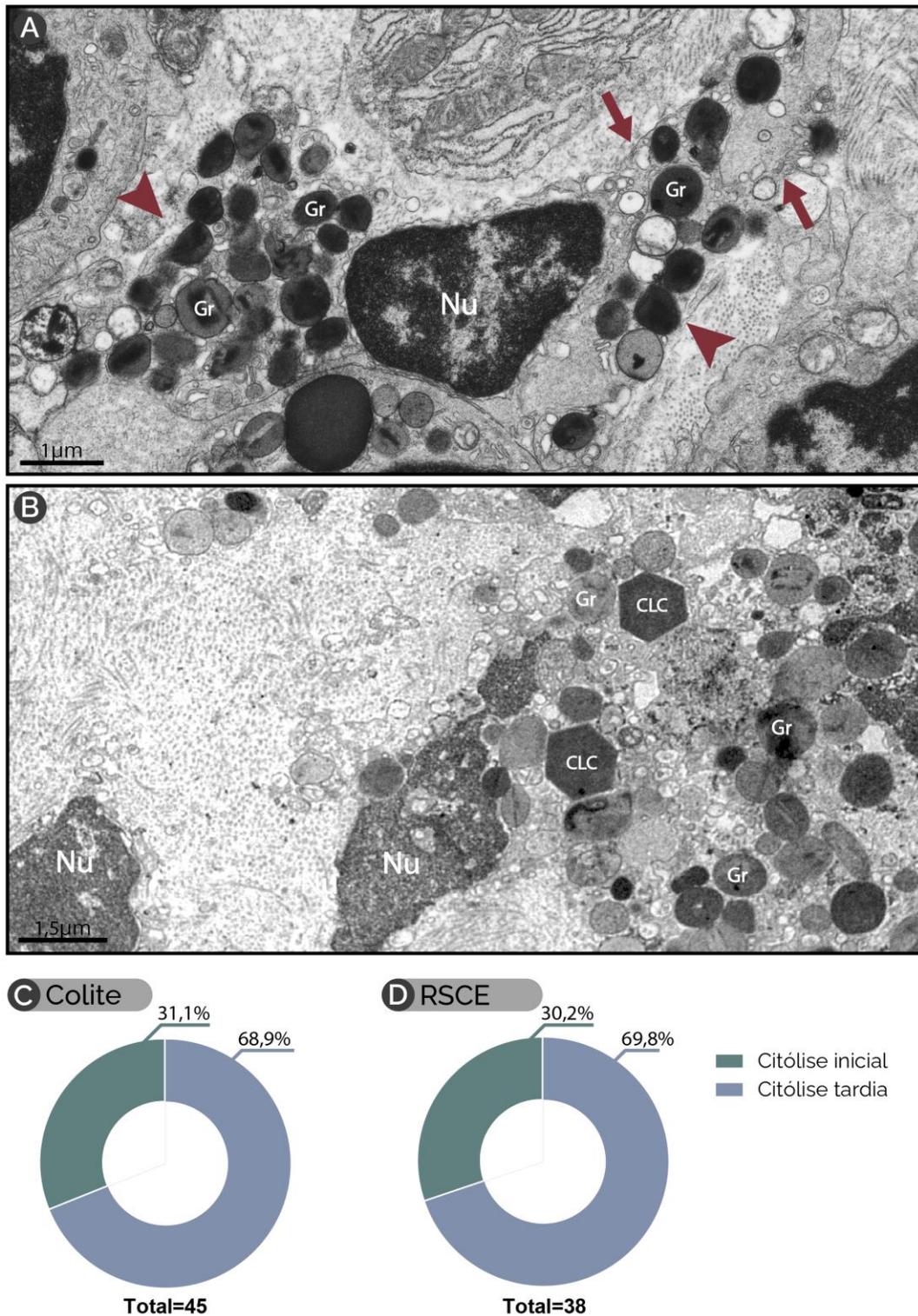


Figura 11 – Diferentes estágios de eosinófilos citolíticos teciduais em doenças eosinofílicas. (A) Eosinófilo na colite ulcerativa apresentando características de citólise inicial, com grânulos (Gr) ainda agregados e rompimento da membrana plasmática (cabeças de seta), mas com a mesma ainda preservada em algumas regiões (setas). **(B)** Eosinófilos na RSCE em citólise tardia, com grânulos livres (Gr) depositados e mais espalhados pelo tecido e ausência total de membrana plasmática. **(C e D)** Proporção de eosinófilos apresentando cada um dos estágios da citólise. Nu: conteúdo nuclear. CLC: cristal de Charcot-Leyden.

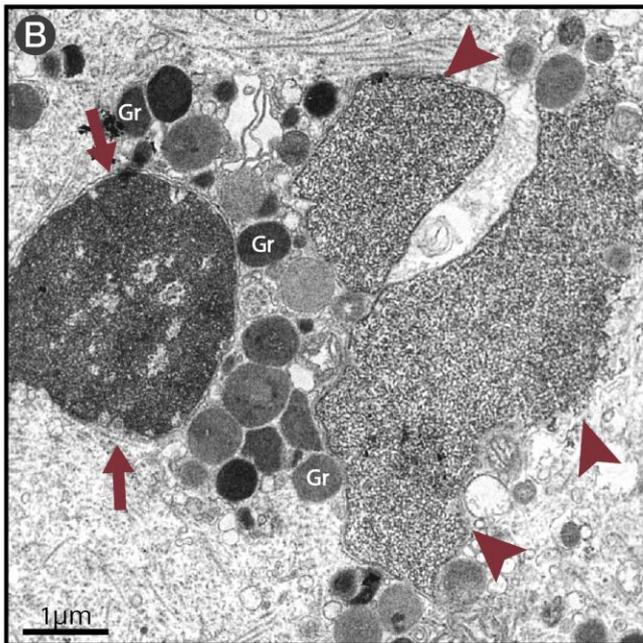
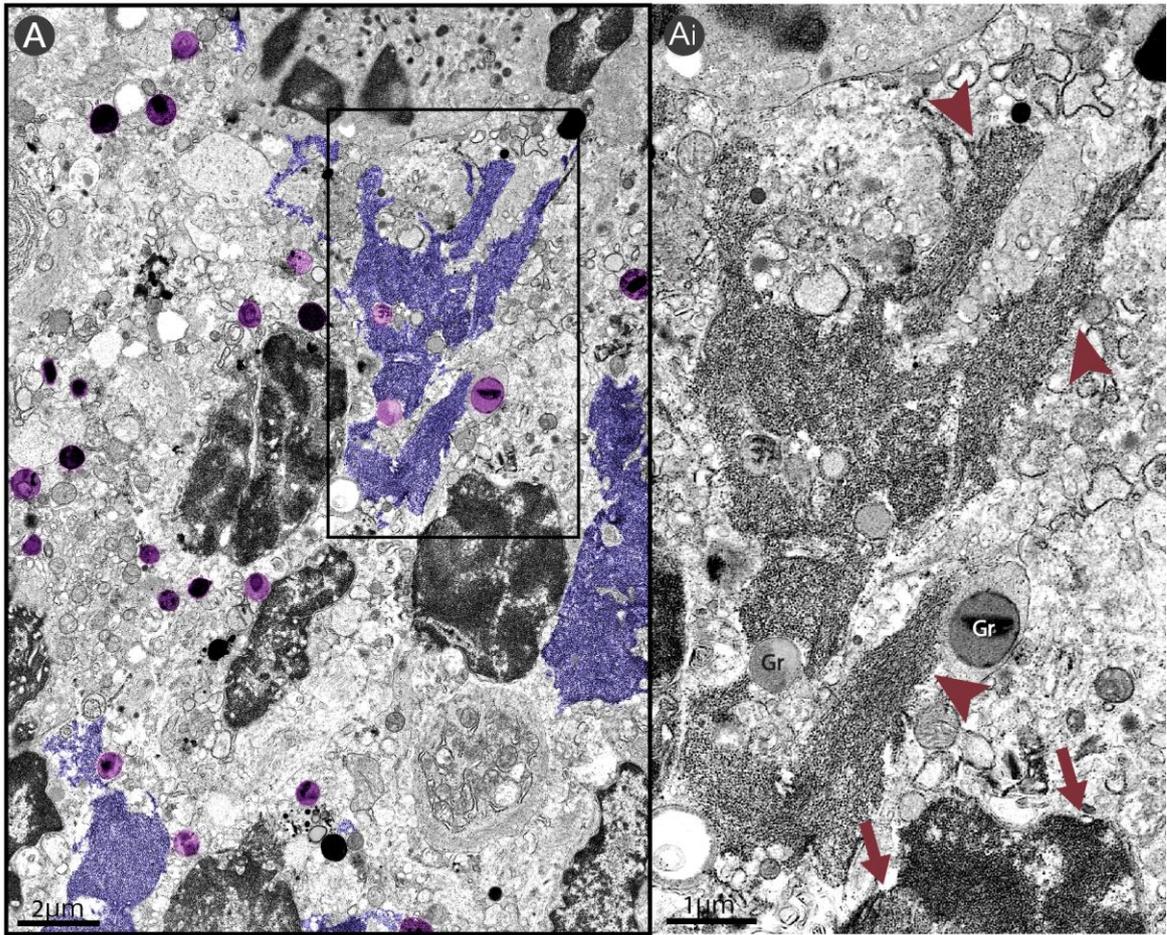
5.2. Eosinófilos teciduais sofrendo ETose são frequentemente observados na colite ulcerativa e RSCE

Uma vez definidos estágios distintos de progressão da citólise, procuramos avaliar se esses eosinófilos em citólise também exibiam características morfológicas de ETose. A nível de MET, evidências de citólise com características de ETose incluem a perda do típico padrão lobulado do núcleo (delobulação/arredondamento) e das bem definidas áreas de eucromatina/heterocromatina vistas em células íntegras. Estas alterações são resultado de uma extensa descondensação e expansão da cromatina, que é seguida pela ruptura das membranas nuclear e plasmática, permitindo a liberação de ETs (Barroso *et al.*, 2021). As alterações celulares em decorrência da ETose são bem caracterizadas em neutrófilos (Fuchs *et al.*, 2007; Yipp *et al.*, 2012), mas ainda pouco exploradas em eosinófilos, havendo apenas escassos estudos *in vitro* (Barroso *et al.*, 2021).

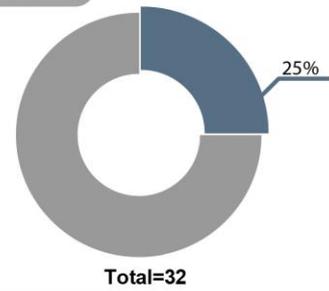
5.2.1. Evidências ultraestruturais da liberação de ETs são observadas no tecido após a ruptura do eosinófilo

No presente trabalho, observamos a presença de ETs, identificadas como depósitos de cromatina totalmente descondensada e espalhada no tecido, com ausência total ou parcial de envoltório nuclear (Figuras 12A e B). Grânulos de eosinófilos livres e íntegros estavam associados com os depósitos extracelulares de cromatina, indicando que estas ETs têm origem a partir da morte citolítica do eosinófilo. Esta associação entre FEGs e ETs é uma forte evidência da ocorrência da ETose do eosinófilo.

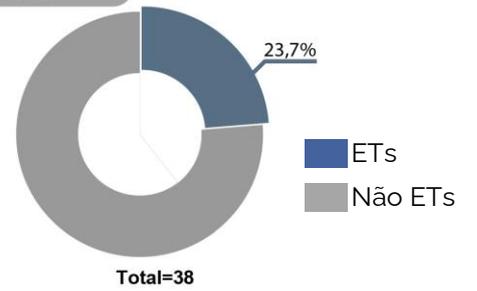
Porém, nem toda morte citolítica do eosinófilo irá levar à formação de redes de DNA (Ueki *et al.*, 2013). Isso se torna evidente quando observamos que alguns dos conteúdos nucleares depositados no tecido por eosinófilos em citólise, são núcleos relativamente íntegros, muitas vezes com envoltório nuclear presente ou mesmo com clara distinção entre eu- e heterocromatina (Figuras 12A e B). Realizando análises quantitativas, destacamos que cerca de 1/4 destes conteúdos nucleares representaram tipicamente as EETs propriamente ditas, correspondendo a 25% na colite e 23,7% na RSCE (Figuras 12C e D).



C Colite



D RSCE



▲ **Figura 12 – Evidências ultraestruturais da liberação de ETs do eosinófilo *in vivo*.** (A) Região do tecido inflamado na colite ulcerativa apresentando grânulos de eosinófilos livres (roxo) e regiões de depósito de cromatina descondensada com ausência de envoltório nuclear (azul). Em maior aumento (Ai), pode-se observar mais claramente um desses depósitos (cabeças de seta) próximos a grânulos (Gr). Na RSCE (B), depósitos de cromatina com as mesmas características (cabeças de seta) também podem ser observados próximos a grânulos livres de eosinófilos (Gr). Núcleos com regiões de cromatina condensada e envoltório nuclear relativamente íntegros (setas) também podem ser observados nas mesmas regiões no tecido em ambas as imagens. (C e D) Proporção de núcleos de eosinófilos apresentando cromatina totalmente descondensada e ausência de envoltório nuclear (*extracelular traps* - ETs).

5.2.2. Alterações da cromatina antes da formação das ETs

Como discutido previamente, existem sequências de eventos anteriores à liberação de redes de DNA na ETose os quais são particularmente observados por MET. Por isso, além de investigar a formação de EETs, também avaliamos a ocorrência desses eventos *in vivo*.

Entre os núcleos de eosinófilos em citólise que mantinham seu envelope nuclear completo, pudemos perceber dois padrões ultraestruturais de organização da cromatina: i) núcleos com distinção entre eu- e heterocromatina (Figura 13A); e ii) núcleos que apresentavam a cromatina totalmente descondensada (Figura 13B). Importante destacar que neste primeiro grupo, apesar de apresentarem distinção entre eu- e heterocromatina, o padrão ultraestrutural comumente se diferencia do padrão observado em núcleos de células íntegras, por apresentarem um formato mais arredondado e a eucromatina mais abundante em comparação com células não-citolíticas. O segundo grupo, por sua vez, representa eosinófilos em ETose, porém em estágios mais iniciais, com potencial de formarem ETs (Figura 13C) no momento em que seus envoltórios nucleares forem rompidos.

Considerando como núcleos de eosinófilos em ETose aqueles com cromatina totalmente descondensada, preservando (pré-ETs) ou não (ETs) o envoltório nuclear, pudemos perceber que a porcentagem de eosinófilos em ETose se torna mais significativa do que aquela mostrada anteriormente (Figuras 12C e D). Com 46,9% na colite e 39,5% na RSCE (Figuras 13D e E). Considerando apenas os núcleos de

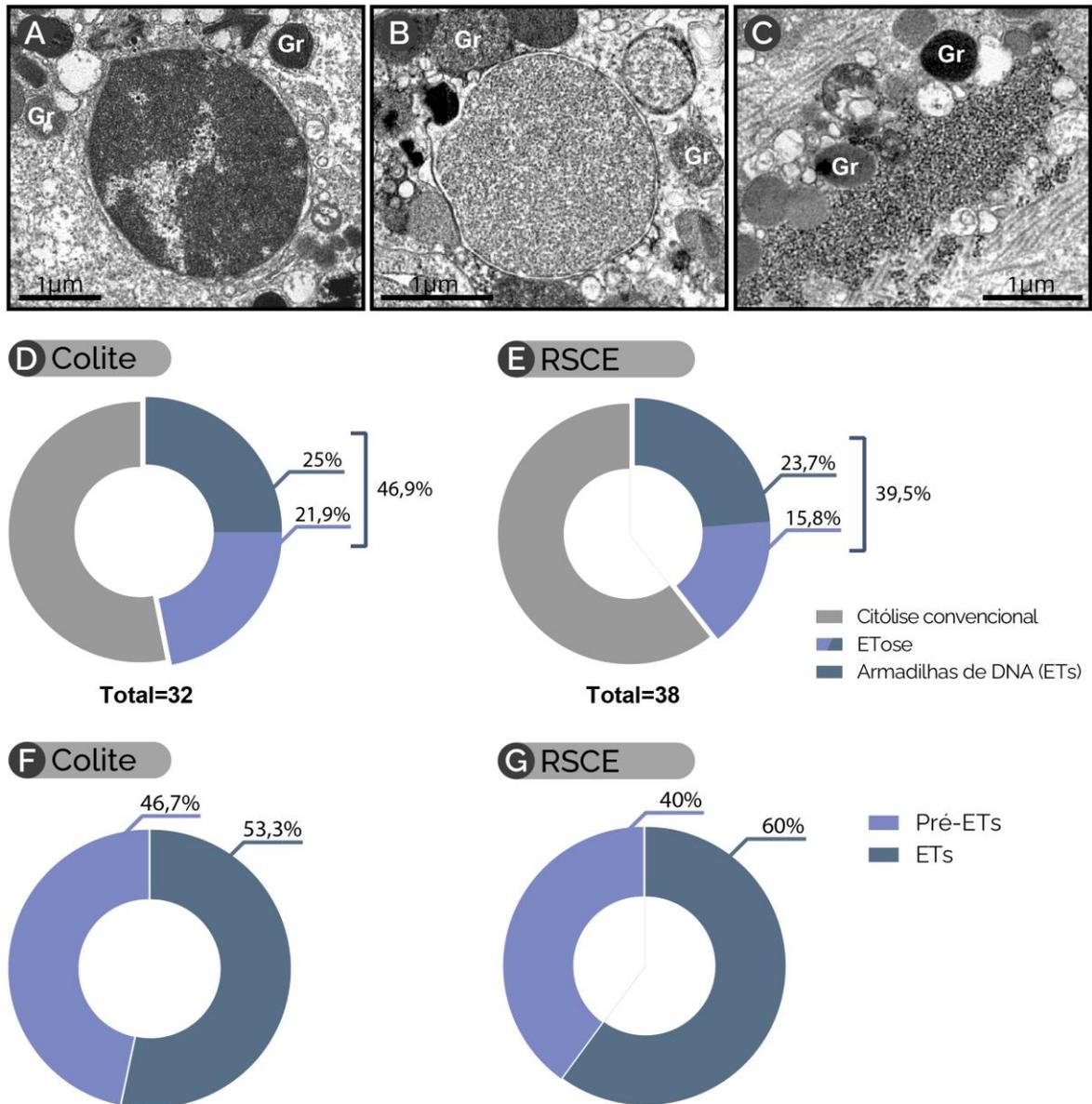


Figura 13 – Frequência das características ultraestruturais da ETose de eosinófilos nas doenças eosinofílicas. (A) Eosinófilo em citólise convencional na RSCE apresentando núcleo com regiões de cromatina condensada. **(B)** Eosinófilo em ETose na colite apresentando cromatina totalmente descondensada e envoltório nuclear sem sinais de rompimento, fase anterior à formação de armadilhas de DNA. **(C)** Eosinófilo em ETose na RSCE com ausência de envoltório nuclear e cromatina totalmente descondensada espalhada no tecido (ETs). **(D e E)** Proporção de núcleos de eosinófilos citolíticos apresentando cada uma das características estruturais descritas. **(F e G)** Proporção de núcleos de eosinófilo em estágio de pré formação de ETs e após formação de ETs. Gr: grânulo.

eosinófilos em ETose, vemos que 53,3% já formaram ETs na colite e 46,7% ainda têm o potencial para formá-las (Figura 13F). Na RSCE, 60% dos conteúdos nucleares da ETose se apresentam como ETs e os outros 40% ainda mantêm seus envoltórios nucleares (Figura 13G). Importante destacar que os núcleos que ainda não formaram ETs podem ser observados em eosinófilos nos diferentes estágios de progressão da citólise, estando presentes tanto em células que ainda preservam parte de suas membranas plasmáticas, quanto naquelas onde a membrana plasmática está ausente. Por outro lado, as ETs, são em sua maioria observadas em eosinófilos em citólise tardia, sendo raramente vistas naqueles onde a membrana plasmática se encontra, mesmo que parcialmente, preservada.

Para verificar se a descondensação da cromatina é acompanhada por uma expansão nuclear, medimos a área de cromatina de eosinófilos intactos, sem alterações nucleares (Figura 14A), e a de núcleos com cromatina totalmente descondensada (Figuras 14B e C), considerando apenas aqueles em que o envoltório nuclear não estava rompido. As análises quantitativas (Figura 14D) nos mostram que há uma expansão significativa quando comparamos a área da cromatina normal de células intactas com a área da cromatina totalmente descondensada de eosinófilos em ETose ($8,9\mu\text{m}^2 \pm 0,6$ e $16,3\mu\text{m}^2 \pm 1,9$, respectivamente; média \pm EPM; $P < 0,0001$). Representando um aumento de 43% na área nuclear. Também medimos e comparamos a área daqueles núcleos de eosinófilos em citólise sem descondensação completa da cromatina, exemplificados na Figura 5.4A, novamente considerando apenas os que mantinham o envoltório nuclear completo. A área média destes ($10,6\mu\text{m}^2 \pm 1$, média \pm EPM) é estatisticamente igual às áreas de núcleos normais ($P = 0,39$) e reduzida em comparação com os núcleos considerados expandidos ($P < 0,01$) (Figura 14D). Em eosinófilos no tecido, a expansão da cromatina também leva à delobulação do núcleo, pois aqueles com cromatina totalmente descondensada e com o aspecto ainda lobulado, exemplificado na Figura 14B, são raramente encontrados. A expansão da cromatina, provavelmente, acontece concomitantemente com o rompimento da membrana plasmática, pois eosinófilos com estas características nucleares estão em sua maioria apresentando algum grau de desestruturação da membrana celular.

Desta forma, a ETose em eosinófilos pode ser identificada ultraestruturalmente *in vivo*, pela descondensação total da cromatina que será sucedida ou acompanhada

pelas características clássicas da citólise (rompimento da membrana plasmática e liberação extracelular de grânulos secretores íntegros). Esta cromatina pode estar ainda envolta pelo envelope nuclear, ocasionando um arredondamento e expansão do núcleo, ou pode ser encontrada depositada e espalhada no tecido, em decorrência da ruptura e dissolução da membrana nuclear, formando as ETs.

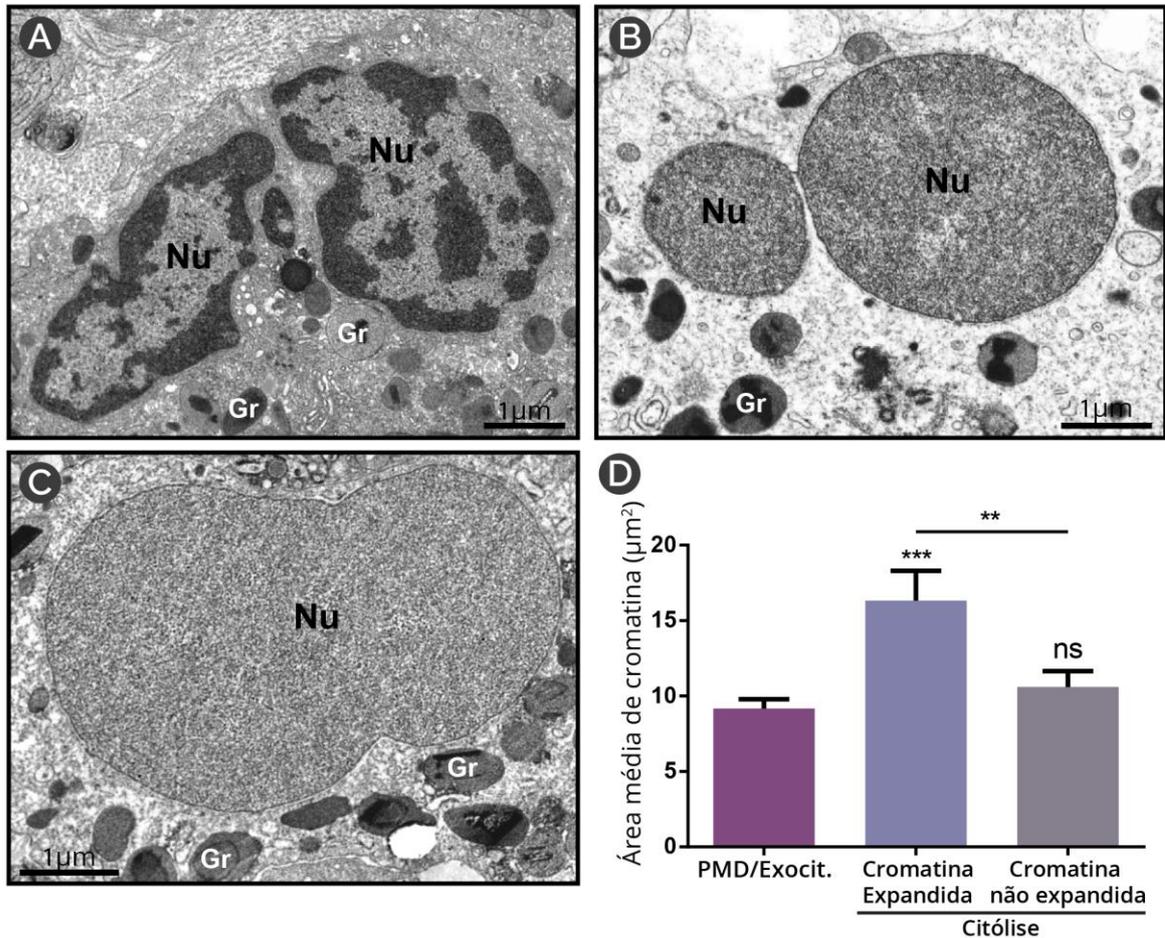


Figura 14 – Expansão da cromatina em núcleos intactos de eosinófilos teciduais *in vivo*. (A) Eosinófilo em PMD na RSCE, apresentando núcleo (Nu) normal, bilobado e clara distinção entre eucromatina e heterocromatina. (B) Eosinófilo em estágio inicial de citólise na colite ulcerativa, apresentando citoplasma rarefeito, núcleo (Nu) com cromatina totalmente descondensada e apresentando sinais iniciais de delobulação. (C) Eosinófilo na colite ulcerativa em estágio inicial da citólise com cromatina totalmente descondensada e núcleo (Nu) delobulado. (D) Comparação da área média de cromatina de núcleos com envoltório nuclear íntegro de células íntegras e em citólise. Dados representados por média \pm EPM; *** $P < 0,0001$ vs. cromatina normal; ns $P = 0,39$ vs. cromatina normal; ** $P < 0,01$ vs. cromatina totalmente descondensada. Gr: grânulo.

5.3. Alterações do envoltório nuclear estão relacionados com a citólise *in vivo*

Analisando os núcleos de eosinófilos em citólise pudemos perceber, em alguns destes, alterações no envoltório nuclear. A mais evidente destas, consistiu na expansão de áreas do envoltório (dilatação do espaço perinuclear entre as duas membranas do envoltório) (Figuras 15 e 16A). Este fenômeno foi observado tanto em núcleos pré-ETs (Figura 15A) quanto naqueles da citólise convencional (Figuras 15B e 16A). No interior destas regiões de expansão, foram vistas estruturas de elétron densidade moderada, vindas aparentemente a partir da cromatina (Figura 15). Uma porcentagem relevante dos núcleos de eosinófilos em citólise apresentaram expansão de membrana, 50% na colite e 71,4% na RSCE (Figuras 16B e C). Núcleos pré-ETs representaram a minoria com 15% na colite e 19% na RSCE. A maior parte dos núcleos com expansão do envoltório foram os com cromatina não expandida, 35% na colite e 52,4% na RSCE. Isso pode ser explicado por considerarmos para essa análise, apenas núcleos sem rompimento do envoltório, e os núcleos sem expansão da cromatina são predominantes neste grupo. A membrana de origem deste expansão não pode ser verificada de forma clara nas nossas micrografias, se este descolamento ocorre a partir da membrana externa, como descrito em neutrófilos (Pilszczek *et al.*, 2010), ou se acontece nas duas membranas do núcleo, permanece uma questão em aberto.

Além disso, outro fenômeno que nos chamou atenção, foi a presença de vesículas (Figuras 15 e 17A; asteriscos) comumente próximas ao núcleo e às regiões de expansão da membrana nuclear. No interior destas vesículas observamos acúmulos de elétron-densidade média semelhantes às estruturas observadas no interior das regiões de descolamento (Figura 15). Em neutrófilos, vesículas semelhantes já foram identificadas *in vitro*, também associadas ao expansão do envelope nuclear (Pilszczek *et al.*, 2010). Por esses motivos, acreditamos que estas vesículas que identificamos em eosinófilos citolíticos tenham origem a partir do envoltório nuclear. Em neutrófilos, os acúmulos encontrados no interior destas vesículas são considerados como estruturas originárias da cromatina, e é levantada a hipótese de que este seria um mecanismo alternativo para a liberação de DNA no meio extracelular (Pilszczek *et al.*, 2010). Nas biópsias estudadas, estas vesículas que chamamos de vesículas nucleares (VNs) estão presentes apenas em eosinófilos com

rompimento ou ausência de membrana plasmática, não sendo vistas em eosinófilos intactos. Apesar de serem propostas como um mecanismo de liberação de DNA, a maior parte dos núcleos onde estas vesículas foram encontradas em proximidade são aqueles sem expansão da cromatina, 20% na colite e 28,6% na RSCE (Figuras 17B e C). Enquanto que a proporção de núcleos com cromatina totalmente descondensada e NVs próximas foi de 10% para a colite e 19% para a RSCE (Figuras 17B e C), novamente considerando apenas os núcleos onde o envoltório nuclear estava presente. No total 30% dos núcleos de eosinófilos citolíticos na colite apresentaram NVs em sua proximidade, enquanto que um número maior (47,6%) foi observado na RSCE. Os dados mostram que este é um evento relevante para a citólise em geral, não apenas para a ETose. Para auxiliar na descrição morfológica destas vesículas, nós medimos suas áreas e diâmetros, e as agrupamos em um gráfico de acordo com seus respectivos tamanhos ($\leq 0,2$; 0,201-0,4; 0,401-0,6; 0,601-0,8; 0,801-1 e $>1\mu\text{m}^2$ para área e os mesmos valores em μm para o diâmetro) (Figuras 17D e E). As NVs encontradas possuem uma área que varia de 0,01 à $2,8\mu\text{m}^2$ e um diâmetro com variação de 0,15 a $2\mu\text{m}$. Apesar disso a maioria (mais de 70%) possuía uma área menor que $0,2\mu\text{m}^2$ em ambas as condições inflamatórias. Em relação ao diâmetro, apesar da distribuição dos tamanhos ser um pouco mais variada em comparação com a área, a maior parte (48% na colite e 40% na RSCE) estavam dispostas na variação entre 0,2 e $0,4\mu\text{m}$.

Esta é a primeira vez que estes eventos, expansão do envoltório nuclear e formação de NVs, são observados no eosinófilo. Além disso é a primeira vez que são descritos *in vivo*, para células do sistema imune.

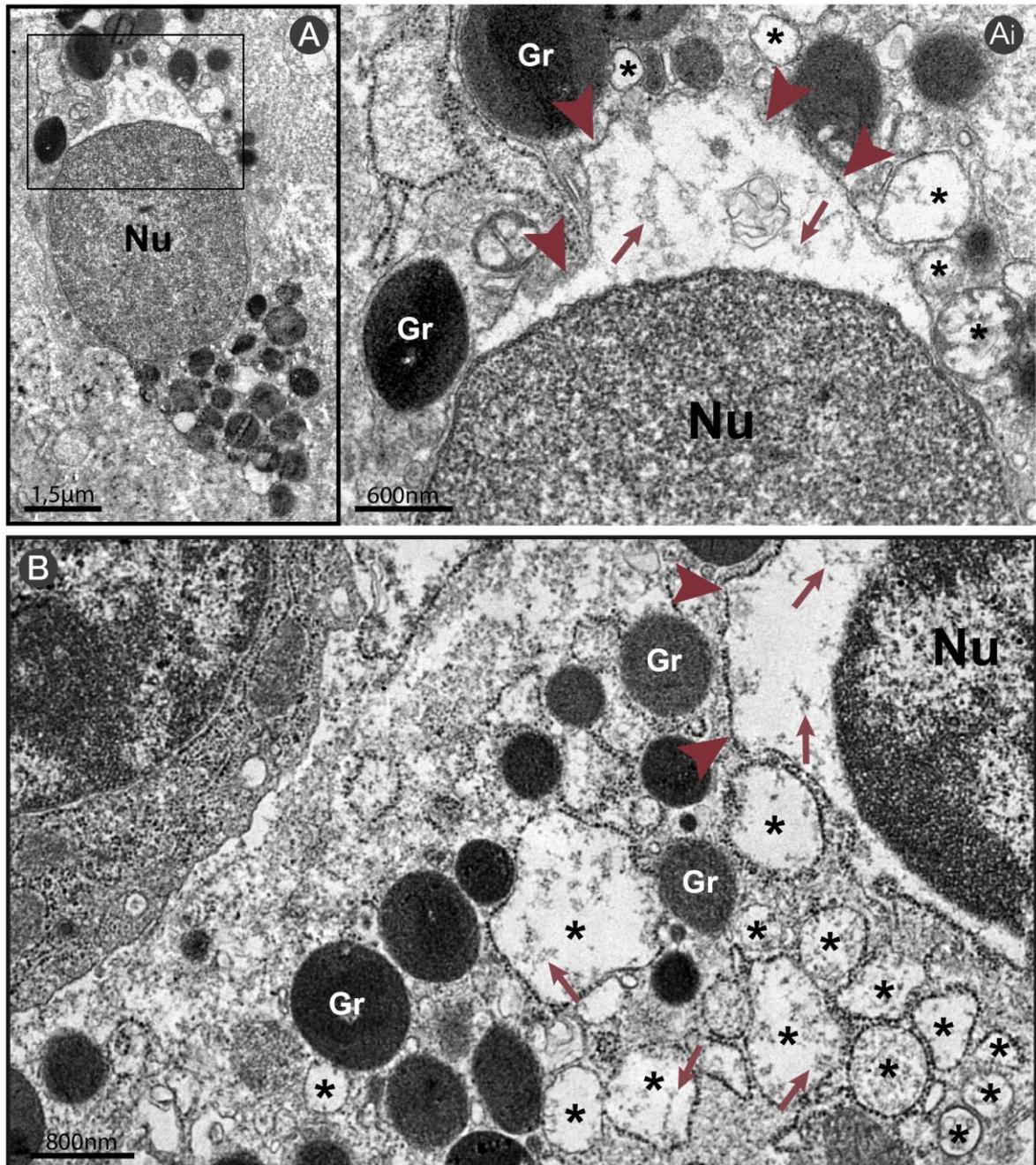


Figura 15 – Alterações do envoltório nuclear durante a citólise do eosinófilo em doenças eosinofílicas. Eosinófilos em citólise na RSCE, um destes com cromatina totalmente descondensada, estágio pré-ETs **(A)** e outro com clara distinção entre eucromatina e heterocromatina **(B)**. Ambas as células apresentam expansão do envoltório nuclear (cabeças de seta). Vesículas nucleares (*) são observadas próximas a estes núcleos. Note estruturas moderadamente elétron-densas (setas) presentes nas regiões de expansão da membrana; estruturas semelhantes também podem ser observadas nas vesículas nucleares. Nu: núcleo. Gr: grânulos

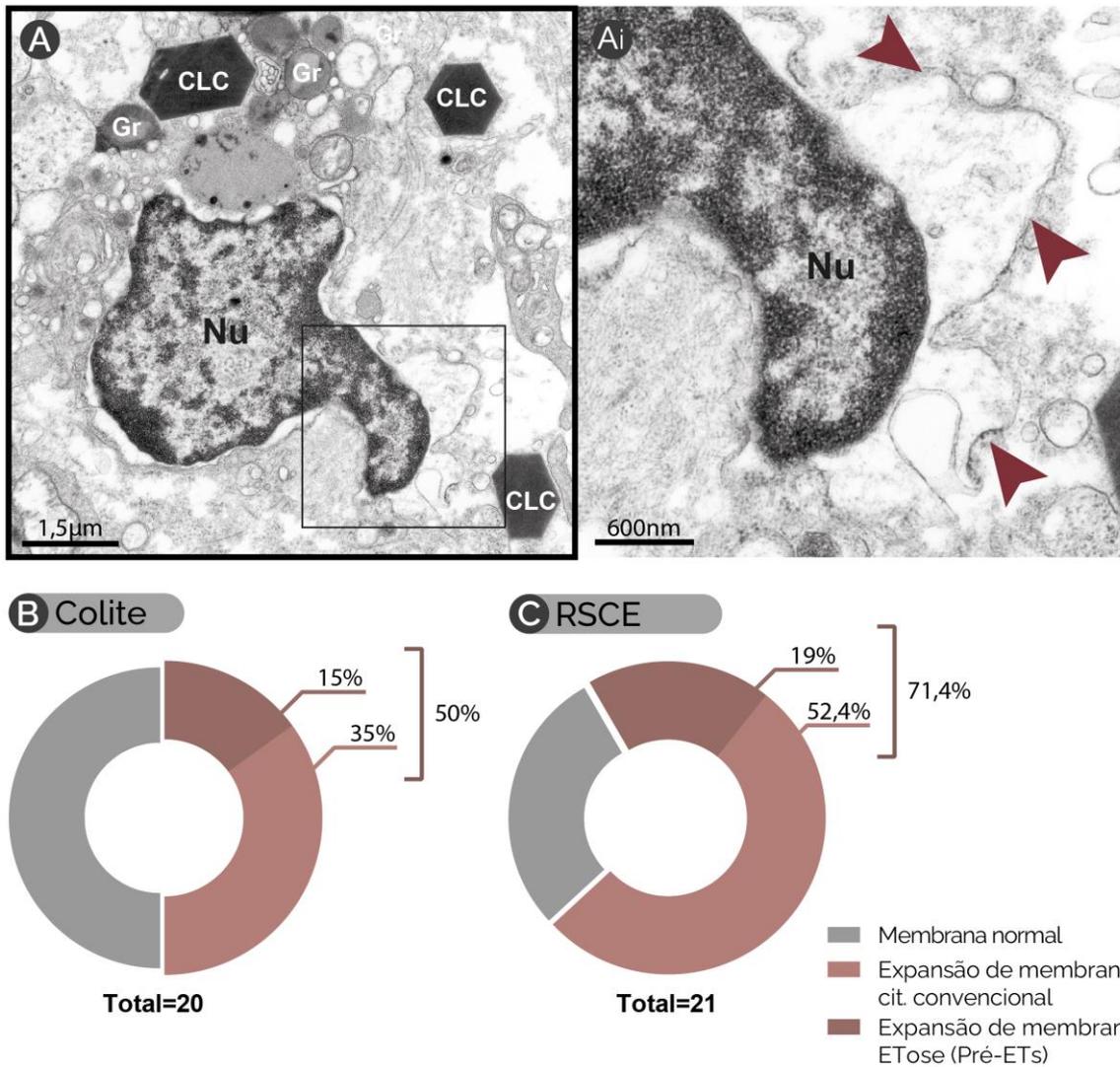
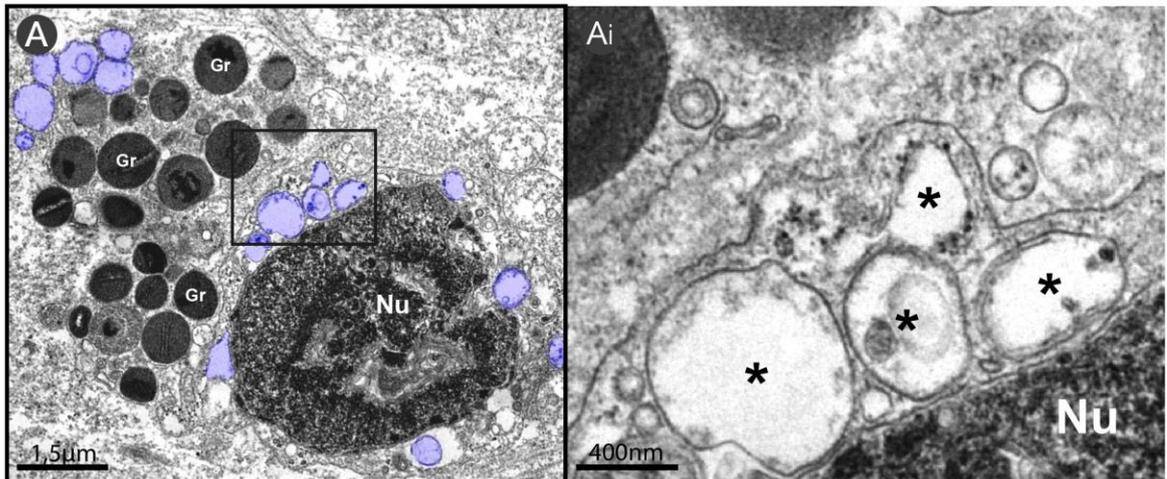
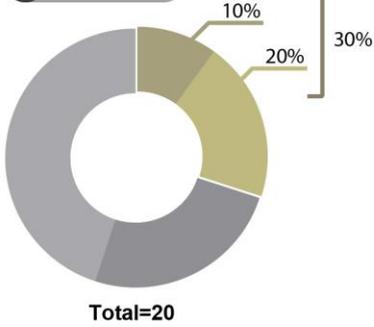


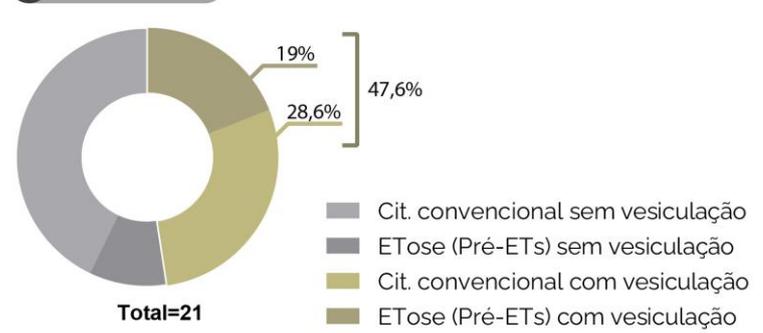
Figura 16 – Separação e expansão de envoltório nuclear durante a citólise do eosinófilo. (A) Eosinófilo citolítico na colite onde o núcleo (Nu) mostra distinção entre eu- e heterocromatina. **(Ai)** Maior aumento evidencia uma região de descolamento do envoltório nuclear (cabeças de seta). **(B e C)** Proporção de núcleos de eosinófilos citolíticos que apresentam expansão da membrana nuclear. Gr: grânulo; CLC: cristal de Charcot-Leyden.



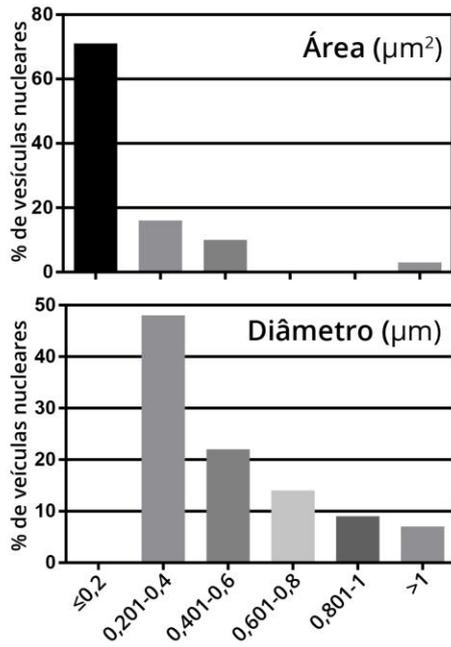
B Colite



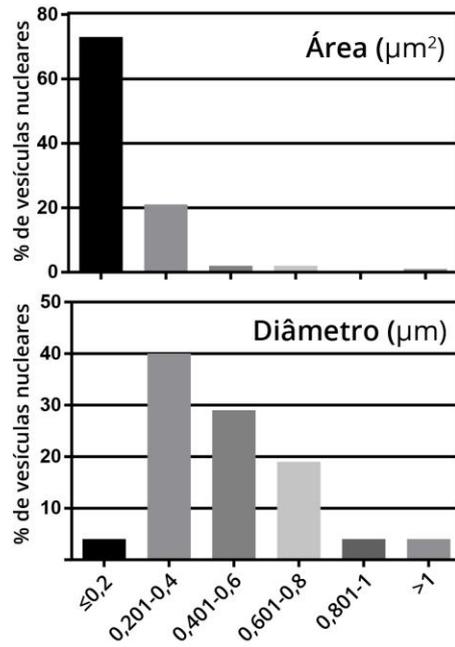
C RSCE



D Colite



E RSCE



▲ **Figura 17 – Vesículas nucleares formadas durante a citólise do eosinófilo *in vivo*.** (A) Eosinófilo em citólise na RSCE com a presença de vesículas nucleares (azul) ao redor do núcleo (Nu) e outras mais distantes próximas aos grânulos (Gr). (Ai) Maior aumento evidenciando algumas das NVs (*). (B e C) Proporção de núcleos de eosinófilos que apresentaram NVs na proximidade. (D e E) Variação da área e diâmetro das NVs.

5.4. Vesículas secretoras de eosinófilos mantêm a integridade após a morte celular

Eosinófilos possuem um proeminente sistema vesicular de transporte intracelular de produtos dos grânulos, com a participação de vesículas típicas, as EoSVs (Melo *et al.*, 2005a; Melo *et al.*, 2008b). Analisando os eosinófilos em citólise presentes nas biópsias de colite ulcerativa e rinosinusite crônica, pudemos perceber a presença dessas vesículas típicas depositadas no tecido, após a morte do eosinófilo (Figuras 18-25). Quando comparamos as EoSVs de células intactas (Figura 18A) com as EoSVs livres no tecido (Figura 18B), podemos perceber que estas continuam apresentando a sua morfologia típica mesmo fora da célula. As EoSVs livres foram encontradas em todos os eosinófilos em citólise, sem exceção. Estando presentes tanto nos eosinófilos em citólise inicial (Figura 19A), quanto nos eosinófilos em citólise tardia (Figura 19B). Para avaliar a integridade destas vesículas no decorrer da citólise, realizamos a quantificação destas e a separação em três grupos: vesículas pertencentes à i) eosinófilos intactos; ii) eosinófilos em citólise inicial e iii) eosinófilos em citólise tardia, como descrito na seção 3.3 da metodologia e 4.3 dos resultados. A média da densidade populacional de EoSVs (EoSVs/180 μ m² de área tecidual) para estes três grupos não apresentou diferença significativa em nenhuma comparação, na colite (17,1 \pm 1,6; 21,8 \pm 2,8; 17 \pm 2,1; intacto, cit. Inicial e cit. tardia respectivamente; média \pm EPM; $P > 0,2$) e na RSCE (16,1 \pm 1,1; 21,2 \pm 3,4; 20,1 \pm 1,9; intacto, cit. Inicial e cit. tardia respectivamente; média \pm EPM; $P > 0,2$), como mostram os gráficos (Figuras 19C e D). Importante destacar que se comparamos qualquer um dos estágios do eosinófilo entre as duas doenças, também não vemos diferenças estatísticas ($P > 0,5$), mostrando que esta densidade populacional segue um padrão mesmo em doenças e tecidos muito diferentes.

Estes dados mostram a presença e integridade de EoSVs livres no tecido, independentes da célula, estabelecendo estas vesículas no meio extracelular como uma característica da citólise de eosinófilos em doenças humanas.

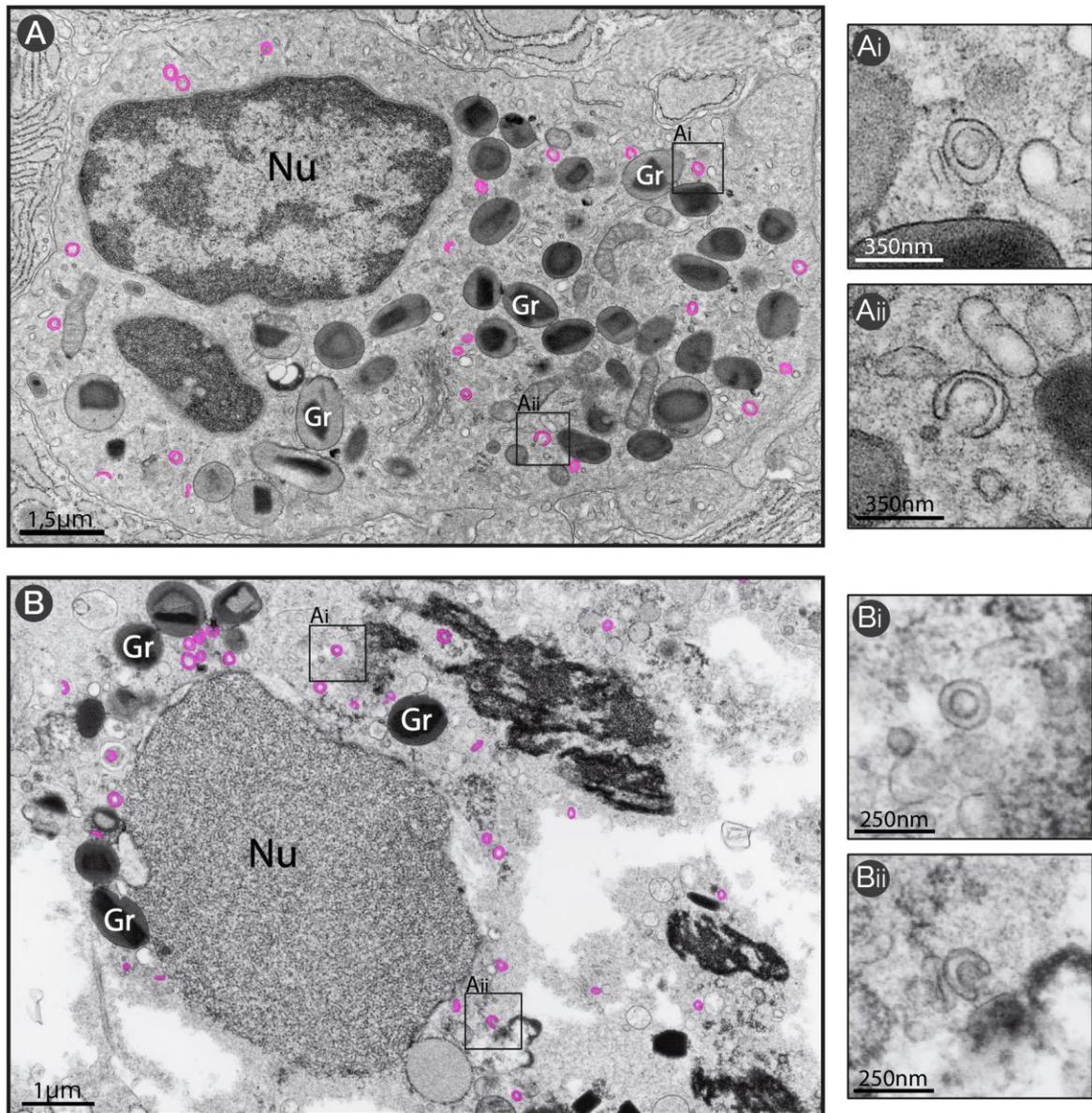


Figura 18 – Presença de EoSVs no meio extracelular após a morte citolítica do eosinófilo em doenças eosinofílicas. (A) Eosinófilo em PMD na colite com EoSVs destacadas em rosa; maior aumento evidencia EoSVs com morfologia típica de “sombbrero” (Ai) e em “C” (Aii). **(B)** Eosinófilo em citólise na colite com EoSVs (rosa) livres e depositadas no tecido; maior aumento evidencia EoSVs com morfologia típica de “sombbrero” (Bi) e em “C” (Bii). Nu: núcleo ou conteúdo nuclear; Gr: grânulo.

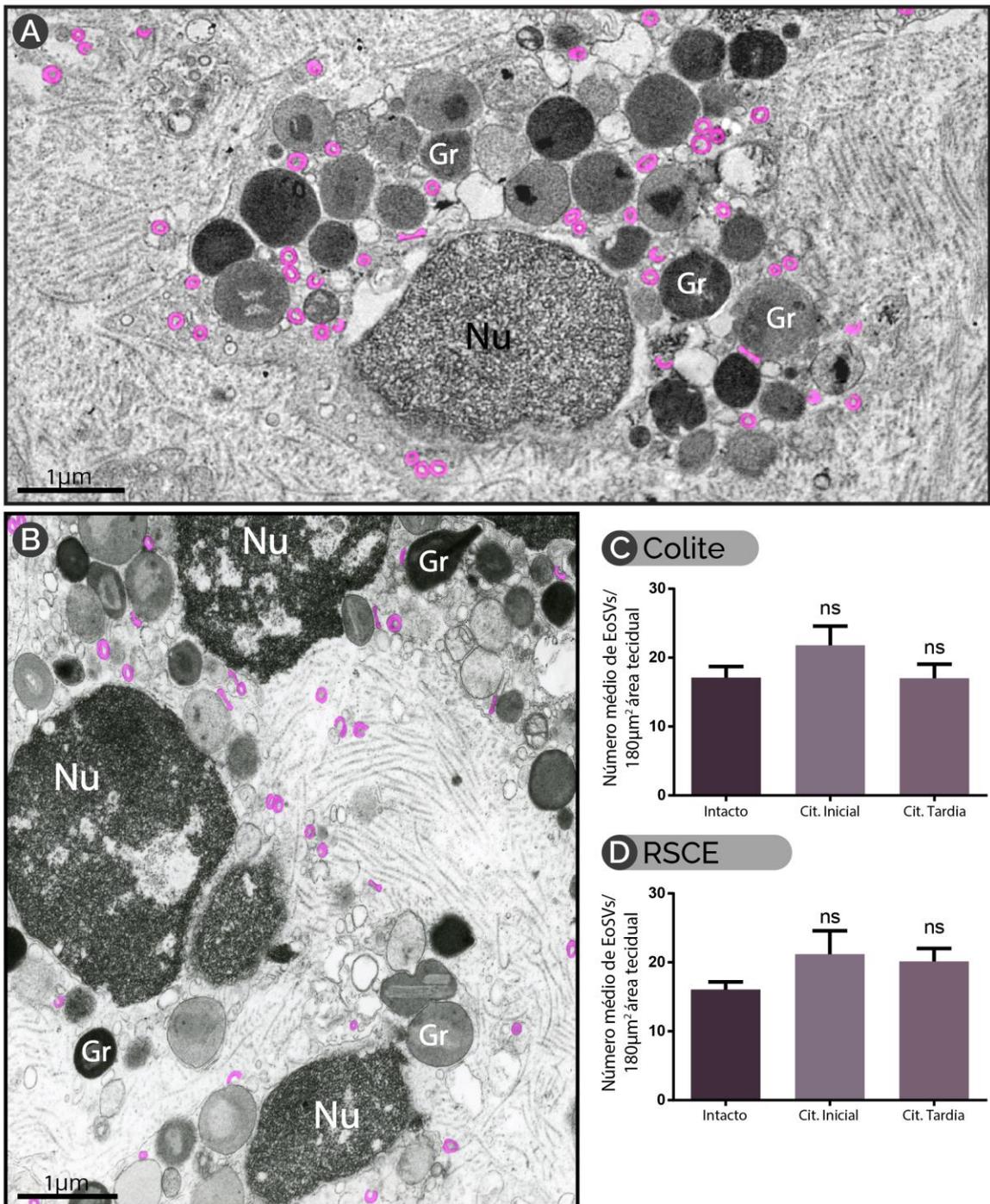


Figura 19 – Integridade de EoSvs após a morte citolítica do eosinófilo em doenças eosinofílicas. (A) Eosinófilo em citólise inicial e **(B)** Eosinófilos em citólise tardia; ambos em biópsias de RSCE e com EoSvs destacadas em rosa. **(C e D)** Número médio de EoSvs por 180µm² de área tecidual contendo eosinófilos ou grânulos de eosinófilos livres; ns $P > 0,1$ em todas as comparações. Nu: núcleo ou conteúdo nuclear; Gr: grânulo.

5.5. Vesículas típicas de eosinófilos são encontradas próximas de diversas estruturas na matriz extracelular

Após mostrarmos a presença das EoSVs livres, decidimos verificar a distribuição e relação destas vesículas com outras estruturas presentes no meio extracelular nas condições inflamatórias. Para estas análises consideramos apenas as EoSVs pertencentes a eosinófilos em citólise tardia, pois estas são vesículas que estão realmente livres no tecido. A estrutura próxima das quais as EoSVs eram abundantemente encontradas, foram os grânulos livres do eosinófilo (Figura 20A). Mais de 60% das EoSVs livres eram encontradas próximas (distância < 1 μ m) à grânulos na colite e RSCE (Figuras 20B e C). Estes dados eram esperados pois ambas as estruturas são derivadas da mesma célula. Em relação aos grânulos uma observação que nos chamou a atenção, foi o contato direto entre estes e algumas das EoSVs livres (Figura 20Ai), representando 16,9% na colite e 13,7% na RSCE (Figuras 20B e C). Apesar dessas observações, algumas EoSVs foram ocasionalmente encontradas a distâncias relativamente grandes dos grânulos mais próximos (Figura 21A), sendo que a mais distante observada, estava a aproximadamente 12 μ m de distância. As EoSVs também foram vistas entre os feixes de colágeno da matriz extracelular (Figura 21A), observação que foi mais frequente na RSCE (38,5% das vesículas) do que na colite (14%) (Figuras 21B e C).

Interessantemente, algumas EoSVs livres foram vistas próximas (distância < 1 μ m) e, ocasionalmente, em contato com células nos tecidos inflamados (Figuras 21A, 22A e 23). Verificando a proporção de EoSVs próximas a células, identificamos 19,8% na colite e 14,3% na RSCE (Figuras 22B e C). A maior parte destas EoSVs livres foram vistas próximas a eosinófilos íntegros e a plasmócitos (38,9% e 30,9%, na colite; eosinófilos e plasmócitos respectivamente; 55,1% e 46,9% na RSCE; eosinófilos e plasmócitos respectivamente) (Figuras 22D e E), nesta análise, desconsideramos as EoSVs que não estavam próximas de nenhuma célula. A proximidade com eosinófilos e plasmócitos ficou mais evidente na RSCE, enquanto que na colite, a interação com outros tipos celulares como mastócitos e neutrófilos foi um pouco mais notável.

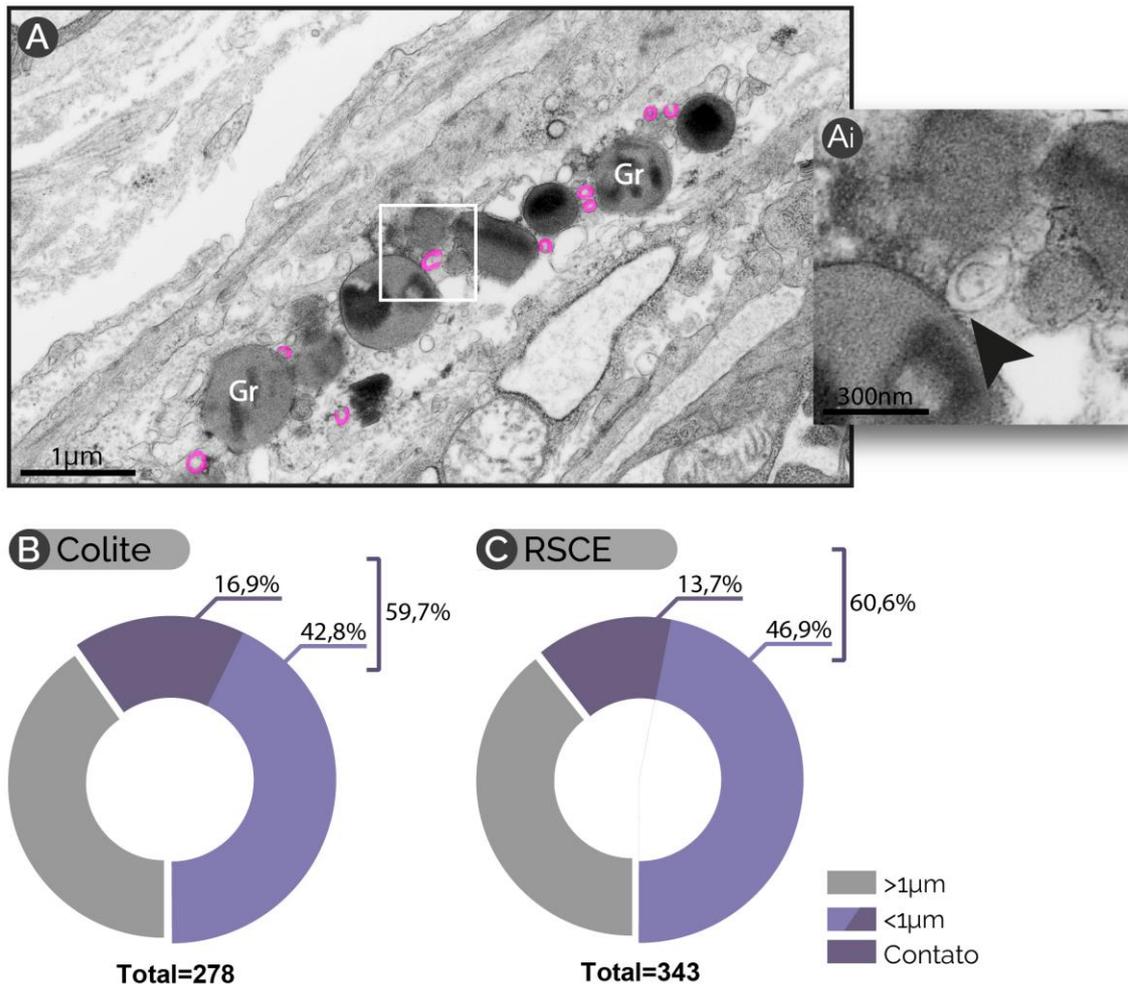


Figura 20 – Proximidade entre grânulos e EoSVs livres no tecido após a morte citolítica do eosinófilo. (A) EoSVs (rosa) e grânulos (Gr) de eosinófilos depositados no tecido na colite ulcerativa. **(Ai)** Maior aumento evidenciando o contato direto entre um grânulo e uma EoSV (cabeça de seta). **(B e C)** Proporção de EoSVs próximas (<1µm de distância) a grânulos livres, dentre estas também se destaca àquelas que estão em contato direto com o grânulo.

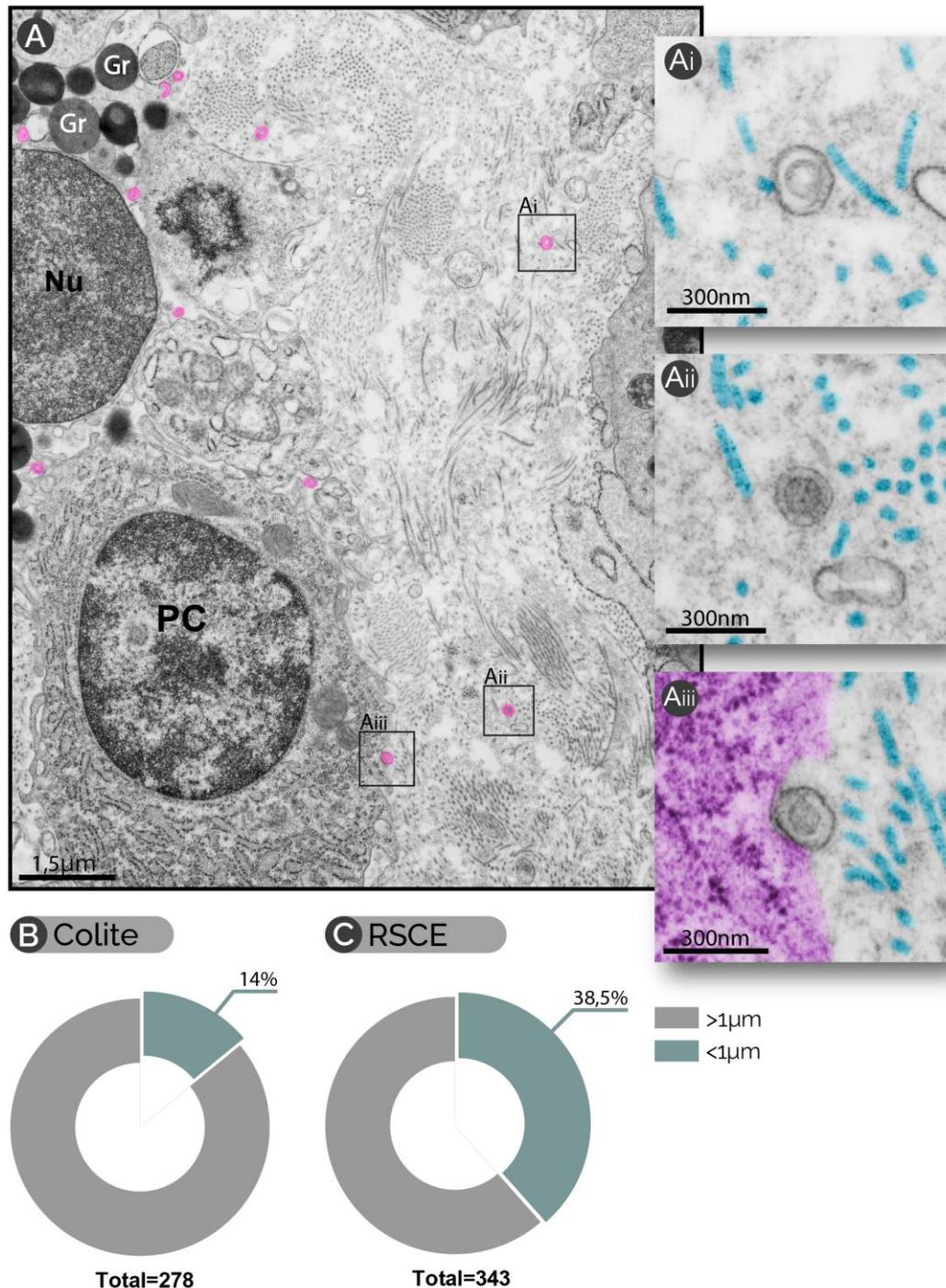


Figura 21 – EoSVs entremeadas aos feixes de colágeno da matriz extracelular nas biópsias de doenças eosinofílicas. (A) Colite ulcerativa, parte de um eosinófilo citolítico (superior esquerdo) próximo de um plasmócito (PC). EoSVs (rosa) podem ser vistas próximas e relativamente distantes dos grânulos (Gr). Algumas das EoSVs podem ser vistas entremeadas aos feixes de colágeno. **(Ai a Aiii)** Maiores aumentos evidenciando a morfologia típica das EoSVs no tecido, com o colágeno próximo destacado em azul. **(Aiii)** Mostra uma EoSV em contato direto com o plasmócito (roxo). **(B e C)** Proporção de EoSVs próximas (<1µm de distância) a feixes de colágeno.

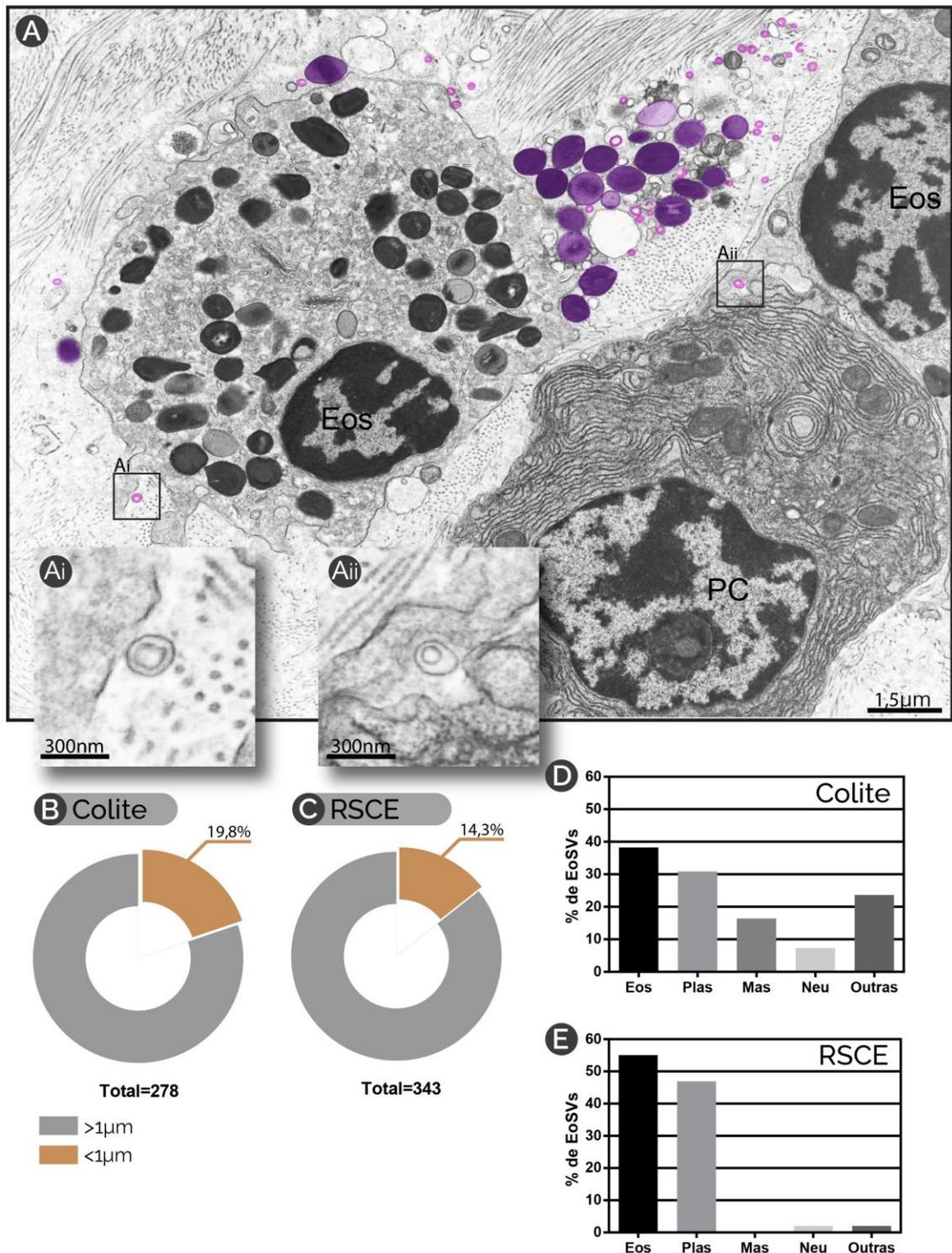


Figura 22 – EoSVs livres próximas a células do tecido inflamado de doenças eosinofílicas. (A) Biópsia de RSCE, um plasmócito (PC) e eosinófilos íntegros (Eos) no mesmo campo que grânulos de eosinófilos (roxo) e EoSVs (rosa) livres. Alguns desses grânulos e vesículas se encontram próximos a estas células do sistema imune. **(Ai)** Uma EoSV em contato direto com um prolongamento citoplasmático do eosinófilo. **(Aii)** Uma EoSV entre um eosinófilo e um plasmócito, em grande proximidade com ambas as células. **(B e C)** Porcentagem de EoSVs próximas (<1µm de distância) a células do tecido. **(D e E)** Distribuição da proximidade de EoSVs em relação aos diferentes tipos celulares.

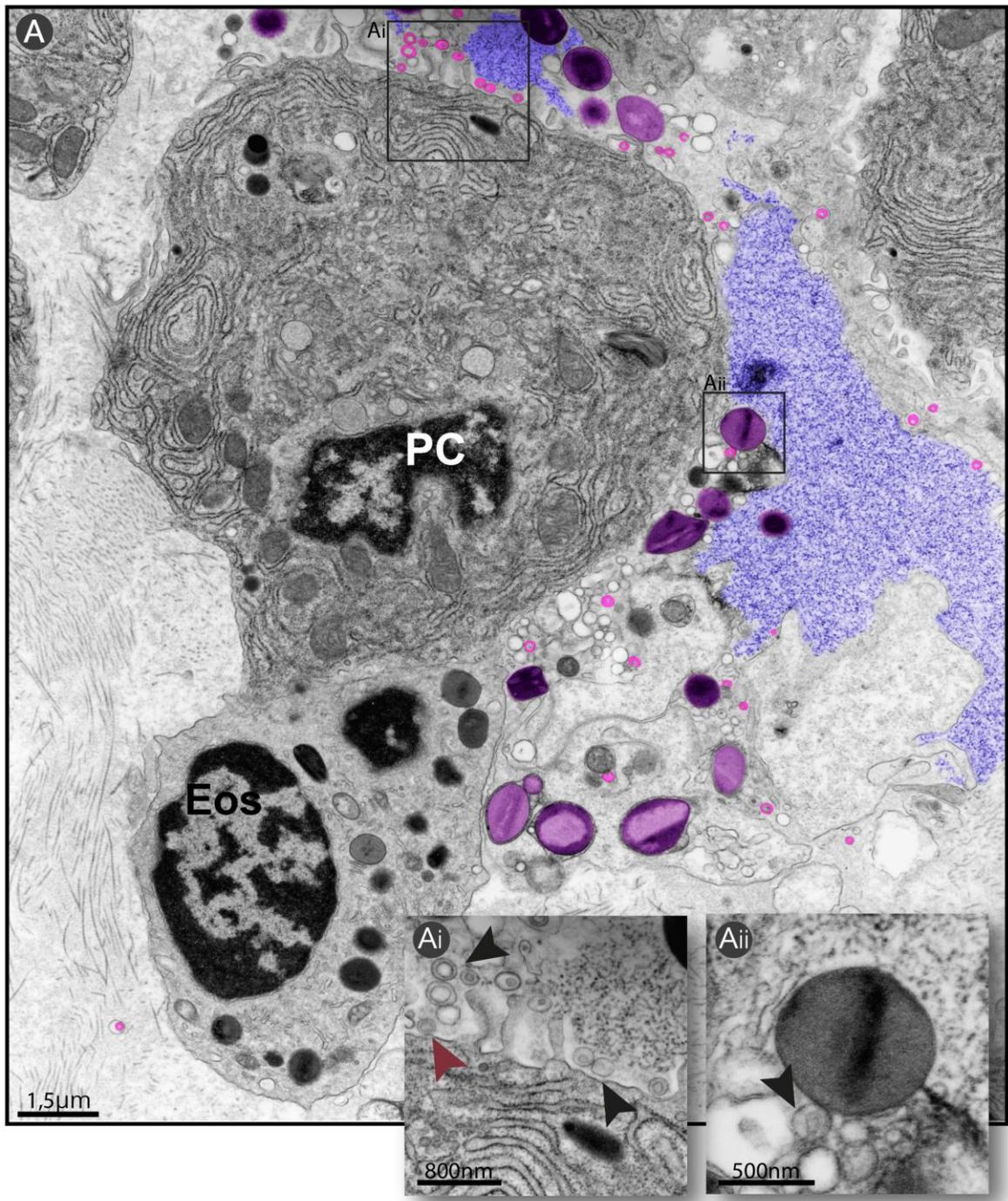


Figura 23 – EoSVs livres próximos a células e armadilhas de DNA no tecido. (A) Biópsia de RSCE mostrando a interação entre um plasmócito (PC) e um eosinófilo (Eos) próximos a armadilhas de DNA (ETs) (azul) com grânulos (roxo) e EoSVs (rosa) próximos e em contato com estas células e com as ETs. **(Ai)** Diversas EoSVs (cabeças de seta) próximas as ETs e ao plasmócito, com uma destas vesículas (cabeça de seta vermelha) em contato direto com o plasmócito. **(Aii)** Uma EoSV (cabeça de seta) em contato direto com um grânulo (centro), que por sua vez está aderido as ETs.

Anteriormente neste trabalho, nós identificamos a presença e as características ultraestruturais da ETose de eosinófilos nas biópsias estudadas (seção 5.2). Juntamente com estes depósitos extracelulares de cromatina descondensada, nós pudemos perceber a presença não apenas de grânulos, mas também de EoSVs livres (Figuras 23 e 24A). Estas EoSVs foram identificadas próximas e aderidas a estas ETs. Porcentagens relativamente pequenas das EoSVs livres foram vistas próximas a estes depósitos de cromatina, com 10,4% na colite e 18,9% na RSCE (Figuras 24B e C). No entanto, como já discutido, apenas 25% dos conteúdos nucleares de eosinófilos citolíticos das biópsias formaram as ETs (Figuras 5.2C e D; Figuras 5.4D e E), assim, considerando apenas micrografias onde as ETs estão presentes, percebemos que essa porcentagem se torna mais significativa, com 30,9% das EoSVs livres próximas das ETs na colite e 37,5% na RSCE (Figuras 24D e E). Dentre estas EoSVs, haviam aquelas em contato físico com os depósitos de cromatina, estas representando 4,3% na colite e 15,5% na RSCE (Figuras 24D e E), novamente, considerando apenas as micrografias onde as ETs estavam presentes.

Outro achado que nos chamou a atenção foi a identificação de um pequeno vaso sanguíneo na biópsia de sino nasal com grânulos e EoSVs livres em seu interior (Figura 25). Isto foi visto em apenas uma ocasião, no entanto possui certa relevância pois a capacidade do eosinófilo de sofrer citólise ainda na corrente sanguínea é pouco conhecida. Próximos das EoSVs livres foram observados depósitos de fibrina, que podem ser indícios de coagulação. Esta foi a única micrografia de um vaso sanguíneo que conseguimos obter nas biópsias, então não podemos fazer afirmações sobre a frequência ou relevância deste fenômeno, mas isto pode ser um importante alvo de estudos futuros.

Em conjunto, estes dados mostram que vesículas de transporte intracelular de produtos do grânulo permanecem íntegras no tecido após a morte celular, e defendemos que estas podem ser consideradas como um novo subtipo de vesículas extracelulares. A proximidade das EoSVs livres com estruturas do tecido inflamado indica possíveis funções destas fora da célula.

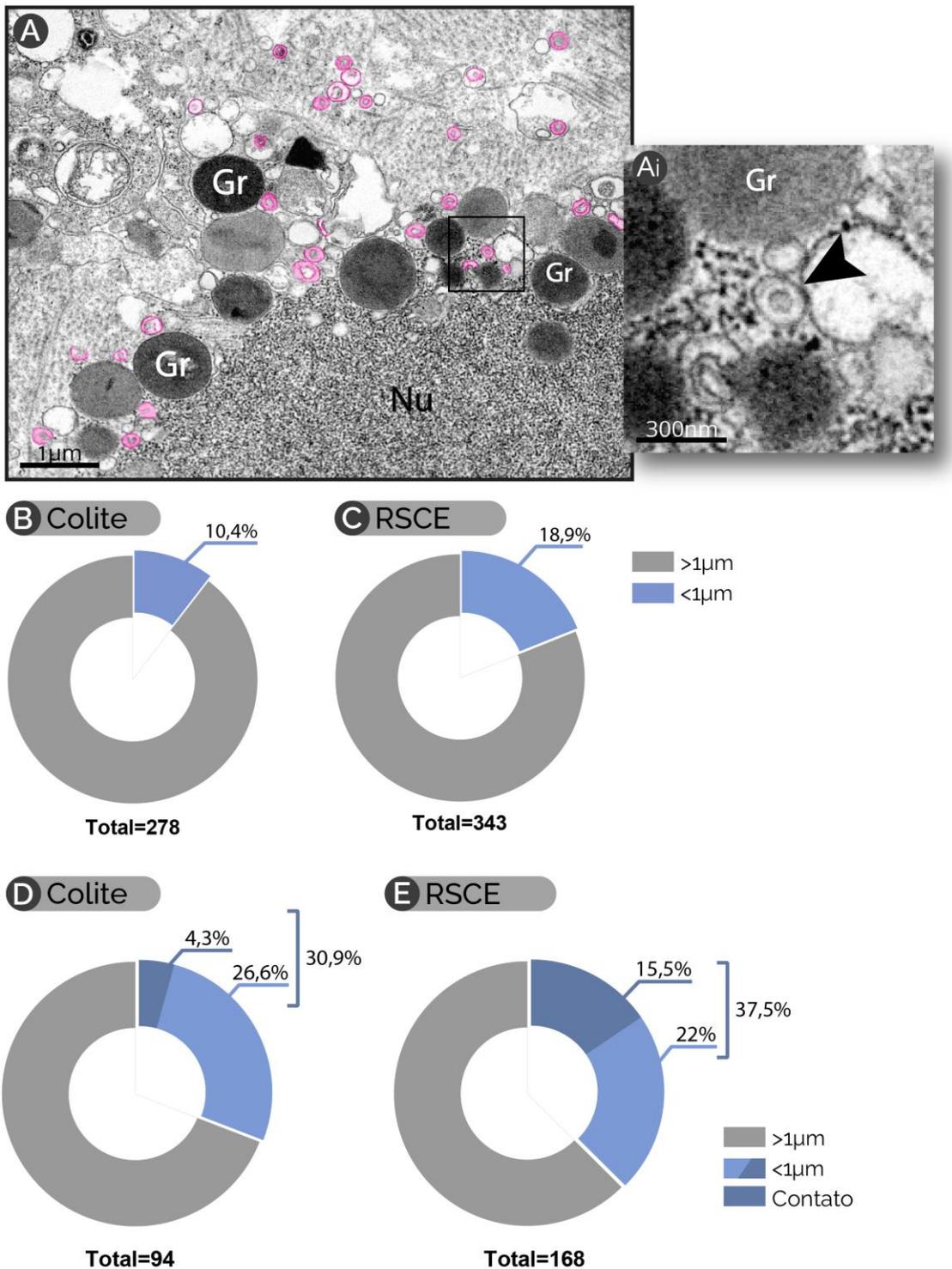


Figura 24 – Proporções de EoSVs associadas às armadilhas de DNA no tecido. (A) Eosinófilo em ETose na RSCE com EoSVs (rosa) e grânulos livres (Gr) aderidos e próximos aos depósitos de cromatina descondensada (Nu). **(Ai)** Maior aumento de uma EoSV (cabeça de seta) em contato com a cromatina extracelular. **(B e C)** Proporção de EoSVs próximas às armadilhas de DNA. **(D e E)** Proporção de EoSVs próximas às armadilhas de DNA considerando apenas imagens onde os depósitos de cromatina estão presentes.

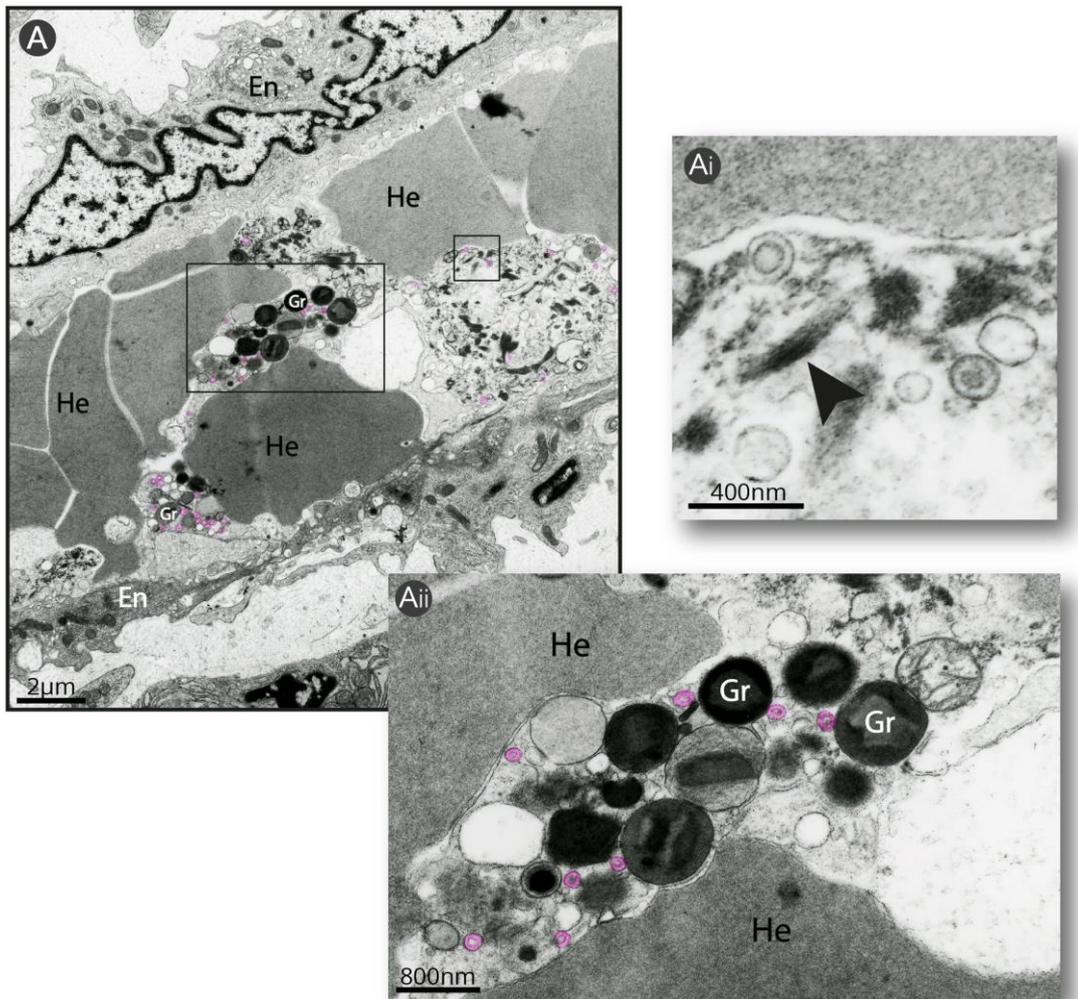
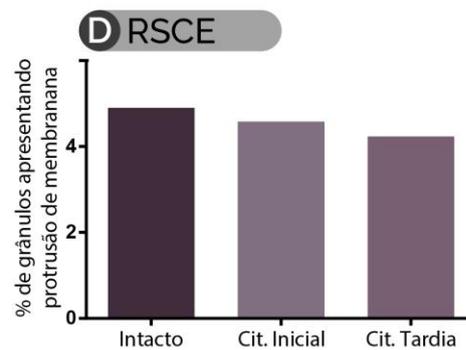
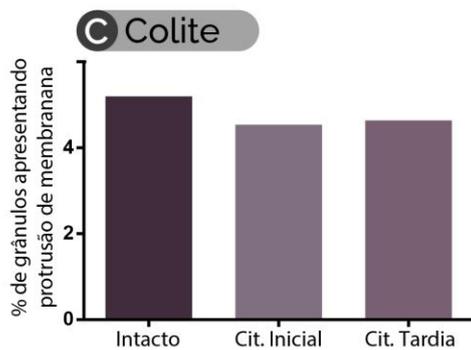
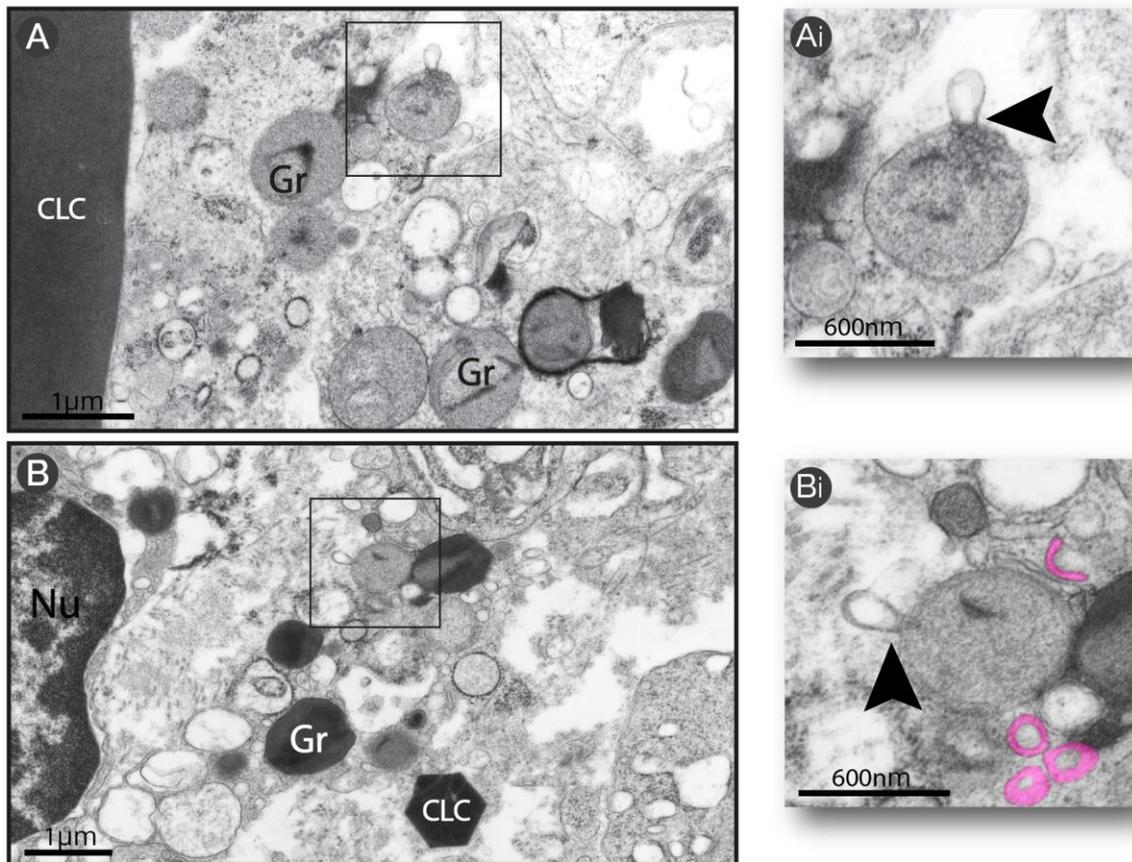


Figura 25 – Citólise do eosinófilo em um pequeno vaso sanguíneo no tecido nasal. (A) Região da biópsia do sino nasal de um paciente com RSCE apresentando um pequeno vaso sanguíneo, percebe-se o endotélio (En) com hemácias (He) e seu interior. Interno ao do vaso, também pode-se perceber grânulos (Gr) e EoSvs (rosa) livres. **(Ai)** Destaque para EoSvs próximas a depósitos de fibrina (cabeças de seta). **(Aii)** Maior aumento de um aglomerado de EoSvs e grânulos livres.

5.6. Grânulos depositados no tecido inflamado mostram sinais de formação de vesículas

Observando os grânulos livres depositados no tecido, percebemos que alguns destes estavam formando evaginações de membrana (Figuras 26A e B). Estas evaginações são características ultraestruturais típicas do brotamento vesicular. Considerando estas protrusões de membrana como regiões de brotamento, não existem característica que indiquem se estas vesículas em formação possuiriam a morfologia típica de EoSvs, ou se estas seriam liberadas como vesículas esféricas

clássicas. Proporções pequenas dos grânulos livres (citólise tardia) apresentavam este fenômeno (4,7% na colite e 4,1% na RSCE) (Figura 26C e D), mas quando tentamos identificar o brotamento de vesículas a partir de grânulos de eosinófilos íntegros ou em citólise inicial, percebemos que a visualização deste evento também é rara, com 5,3% dos grânulos na colite e 4,9% na RSCE realizando protrusões de membrana em células íntegras e 4,1% na colite e 4,2% na RSCE para eosinófilos em citólise inicial. Apesar de serem proporções relativamente próximas, ainda não podemos afirmar que o fenômeno observado em grânulos livres realmente se trata de um brotamento vesicular.



▲ **Figura 26 – Grânulos depositados nos tecidos de doenças eosinofílicas mostram protrusões de membrana similares a brotamentos vesiculares. (A e B)** Grânulos livres (Gr) na colite ulcerativa; um dos grânulos em cada imagem, destacados em **Ai** e **Bi**, apresentam uma protrusão de membrana (cabeça de seta), típica do brotamento vesicular. EoSVs livres próximas ao grânulo destacadas em rosa em **Bi**. **(C e D)** Gráficos representando a porcentagem de grânulos pertencentes a eosinófilos íntegros, em citólise inicial e citólise tardia apresentando protrusões de membrana. Nu: núcleo; CLC: cristal de Charcot-Leyden.

6. DISCUSSÃO

Os eosinófilos são importantes células imunes, que participam das mais variadas respostas inflamatórias (Rothenberg e Hogan, 2006). A função dessa célula se baseia principalmente na secreção de produtos estocados em seus grânulos específicos. No entanto, diferentemente de muitas células secretoras, um dos mecanismos mais importantes pelos quais esta secreção é feita consiste na morte celular (Melo *et al.*, 2013; Spencer *et al.*, 2014). Este tipo de morte é classicamente conhecido como citólise (Figura 6), que consiste no rompimento da célula e na liberação extracelular dos grânulos do eosinófilo, que permanecem intactos e funcionais no tecido, independentemente da célula (Neves *et al.*, 2008; Neves e Weller, 2009). Neste trabalho, nós reforçamos a importância deste mecanismo em eosinófilos presentes em doenças eosinofílicas humanas.

Usando a MET, a técnica mais adequada para identificação dos mecanismos secretores do eosinófilo (Melo *et al.*, 2010a), estudamos biópsias do sino nasal de pacientes com RSCE e do intestino de pacientes com colite ulcerativa. Nossas análises estão de acordo com dados da literatura que mostram a PMD e a citólise como os principais mecanismos secretores do eosinófilo nestas condições (Erjefalt *et al.*, 2001), e nós mostramos que estes estão presentes em proporções parecidas (Figura 10). A exocitose foi encontrada em pequenas proporções e apenas na colite, mas este ainda é um fato interessante, pois a exocitose é um mecanismo secretor raramente encontrado em eosinófilos presentes em doenças humanas *in vivo*. A ultraestrutura da exocitose já foi bem descrita nas doenças inflamatórias intestinais em um trabalho anterior (Dvorak *et al.*, 1993), a pesar das frequências deste mecanismo não terem sido avaliadas. Se a exocitose é mais comum em doenças

relacionadas a este tipo tecidual e se existem estímulos específicos nestas condições que desencadeiem a exocitose, são questões em aberto.

A citólise é um mecanismo de secreção e morte celular do eosinófilo identificado há mais de um século (Persson e Erjefalt, 1997b; a). Ela é um tipo de morte celular que pode ser caracterizado morfológicamente como uma necrose (Ziegler e Groscurth, 2004). No entanto, estudos feitos nas últimas décadas vêm mostrando que existem distintos mecanismos de morte celular que podem apresentar uma morfologia tipicamente necrótica ou citolítica, com rompimento da membrana plasmática e extravasamento de conteúdo citoplasmático (Galluzzi *et al.*, 2018; Nirmala *et al.*, 2020). Dentre estes mecanismos estão presentes, por exemplo, a necroptose, piroptose e ETose (Galluzzi *et al.*, 2018; Nirmala *et al.*, 2020). Este último mecanismo foi primeiramente descrito em neutrófilos e consiste na liberação de redes de DNA nuclear após a ruptura da célula, também chamadas de armadilhas de DNA (Brinkmann *et al.*, 2004; Wartha e Henriques-Normark, 2008). Apesar dos primeiros relatos da liberação de redes de DNA por eosinófilos defenderem que este conteúdo era composto por DNA mitocondrial sem evidências de morte celular (Yousefi *et al.*, 2008), estudos mais recentes vêm mostrando que o eosinófilo também é capaz de liberar redes compostas de DNA nuclear após a morte citolítica da célula (Ueki *et al.*, 2013; Muniz *et al.*, 2018).

No presente estudo, trazemos mais evidências de que a ETose ocorre em eosinófilos. Usando a MET para estudar as características ultraestruturais da citólise do eosinófilo no tecido, percebemos a presença de depósitos de cromatina totalmente descondensada juntamente com os grânulos livres dos eosinófilos. Estes depósitos eram vistos com a membrana nuclear parcialmente ou totalmente ausente e frequentemente se espalhavam pelo tecido (Figura 12). Outros trabalhos já mostraram a presença da ETose de eosinófilos em pacientes com RSCE (Ueki *et al.*, 2013; Ueki *et al.*, 2016), mas aqui é a primeira vez que evidências deste mecanismo são mostradas para eosinófilos na colite ulcerativa. Revisando estudos ultraestruturais anteriores, pudemos perceber que essa característica nuclear com intensa descondensação da cromatina durante a citólise já havia sido relatado sem muita importância (Dvorak *et al.*, 1982; Cheng *et al.*, 1997; Erjefalt *et al.*, 1999; Ahlstrom-Emanuelsson *et al.*, 2004). Como a maioria destes trabalhos foram publicados ainda antes do século atual, a existência e importância da liberação de DNA extracelular era

desconhecida. Atualmente, conhecendo a ETose e sua ultraestrutura *in vivo*, que foi mais profundamente esclarecida no nosso estudo, sabemos que estes eosinófilos citolíticos apresentados nestes trabalhos anteriores representam eosinófilos em ETose. Considerando que estes eosinófilos em morte celular possuem o mesmo aspecto ultraestrutural mostrado por nós, podemos concluir que estas características ultraestruturais seguem um mesmo padrão em diversas doenças.

Observando os núcleos de eosinófilos em citólise, pudemos perceber que suas ultraestruturas eram bem variadas, com muitos destes não formando os depósitos de cromatina propriamente ditos (Figura 13A-C). Alguns apresentavam uma morfologia praticamente normal, em outros um aumento da eucromatina era identificado e também existiam aqueles com a cromatina totalmente descondensada, de forma semelhante ao que acontece nas ETs. Consideramos que este último tipo de núcleo representa também eosinófilos em ETose, mas em estágios mais iniciais, que formarão as armadilhas de DNA assim que seus envoltórios nucleares sejam rompidos (pré-ETs). Assim, a assinatura ultraestrutural da ETose de eosinófilos *in vivo* consiste na descondensação total da cromatina sucedida ou acompanhada pela ruptura da membrana plasmática e deposição de grânulos íntegros no tecido. Esta cromatina podendo se encontrar: i) envolta pelo envelope nuclear, ocasionando um arredondamento e expansão do núcleo; ii) depositada e espalhada no tecido, em decorrência da ruptura e dissolução da membrana nuclear, sendo estas as ETs.

Como a citólise é uma terminologia clássica para o mecanismo de ativação do eosinófilo que consiste na ruptura da membrana plasmática, neste trabalho, consideramos todos os eosinófilos teciduais com esta característica como eosinófilos em citólise. No entanto, mostramos que parte considerável destes eosinófilos em citólise estão sofrendo o mecanismo de morte celular por ETose (Figura 13D e E). Assim, podemos considerar a ETose como uma forma de citólise do eosinófilo. Ao restante dos eosinófilos em citólise que não se encaixavam nas características ultraestruturais da ETose, nós os classificamos como eosinófilos em “citólise convencional”, no entanto não sabemos precisamente quais mecanismos de morte celular estão envolvidos nesta morte citolítica “não ETótica” do eosinófilo.

Na ETose de neutrófilos a descondensação da cromatina é seguida por uma expansão da mesma e conseqüentemente do núcleo (Neubert *et al.*, 2018). Medindo

a área destes núcleos com cromatina totalmente descondensada, verificamos que essa descondensação também está associada a um aumento do tamanho do núcleo de eosinófilos *in vivo* (Figura 14). A área média destes foi significativamente maior quando comparamos com a área de núcleos normais ou com a área de núcleos de eosinófilos em citólise sem descondensação total da cromatina. Além da cromatina em si, observamos alterações também do envelope nuclear de eosinófilos citolíticos (Figura 15). A mais marcante e frequente destas foi a dilatação do espaço perinuclear em regiões do envoltório nuclear (Figura 16), com a presença de estruturas amorfas levemente elétron-densas e vesículas de tamanhos variados (entre 0,15 a 2µm de diâmetro) (Figura 17). Estas vesículas, as quais chamamos de vesículas nucleares (NVs), continham em seu interior estruturas semelhantes àsquelas presentes nas regiões dilatadas do envelope nuclear (Figuras 15 e 17). Destacamos que NVs já foram descritas para neutrófilos em ETose *in vitro*, onde a indução à ETose também levou ao aparecimento de regiões dilatadas do envoltório nuclear, além do aparecimento de vesículas com os mesmos acúmulos levemente elétron-densos mostrados aqui (Pilszczek *et al.*, 2010). Os autores propuseram que as NVs transportam cromatina, sugerindo um mecanismo alternativo para a liberação de DNA extracelular em neutrófilos *in vitro* (Pilszczek *et al.*, 2010).

No presente trabalho, mostramos pela primeira vez a ocorrência de eventos associados com alterações do envoltório nuclear em eosinófilos e a liberação de NVs no tecido. Enquanto o aparecimento dessas vesículas em neutrófilos se iniciou antes da morte celular *in vitro*, as NVs estavam presentes apenas em eosinófilos com algum grau de rompimento da membrana plasmática, sugerindo que a formação destas ocorre concomitantemente com a ruptura celular. Se estas vesículas realmente estão carreando conteúdo nuclear e se elas funcionam como um mecanismo para o espalhamento das redes de DNA do eosinófilo, permanece uma questão em aberto. Interessantemente, estes eventos de alteração do envoltório nuclear foram observados tanto em núcleos de ETose quanto naqueles da citólise convencional, sendo ainda mais frequente neste segundo grupo. A partir disso, podemos concluir que este evento é comum à citólise em geral e não exclusivo da ETose de eosinófilos, gerando dúvidas sobre a funcionalidade destas na liberação de ETs. Ou ainda podemos levantar a hipótese de que estes núcleos ainda possuem o potencial de realizarem a descondensação da cromatina e a formação de redes de DNA. A MET é

uma técnica ainda raramente utilizada para a identificação e estudo da ETose *in vivo*, sendo mais difundida em estudos *in vitro*. No nosso trabalho, propomos a MET como uma importante ferramenta para a visualização da ETose e de alterações estruturais úteis para a identificação de novos fenômenos que decorrem pela morte do eosinófilo.

Juntamente com a citólise, a PMD representa um importante mecanismo de secreção de eosinófilos (Melo *et al.*, 2013). Este mecanismo consiste na liberação de produtos armazenados nos grânulos de maneira gradual e seletiva. O transporte intracelular de produtos armazenados nos grânulos em eosinófilos humanos é feito pelas EoSVs (Figura 5), vesículas grandes e tubulares que apresentam uma morfologia única quando observadas pela MET (Melo *et al.*, 2005a; Melo *et al.*, 2005b). Até o momento a MET é a única técnica conhecida capaz de identificar estas vesículas. Interessantemente, observamos estas EoSVs depositadas nos tecidos, juntamente com os grânulos após a citólise do eosinófilo (Figuras 18-25). Nós mostramos, por análises qualitativas e quantitativas, que as EoSVs são liberadas para o meio extracelular após a morte do eosinófilo e mantêm a sua morfologia típica e integridade mesmo fora da célula (Figuras 18 e 19). Apesar da presença destas vesículas secretoras já ter sido relatada, com pouca importância, em outros trabalhos (Saffari *et al.*, 2014; Ueki *et al.*, 2018), aqui trazemos uma análise mais aprofundada das EoSVs fora da célula e mostramos que estes não são achados meramente esporádicos, mas sim uma característica importante da citólise de eosinófilos.

A maior parte das EoSVs livres são encontradas próximas aos FEGs (Figura 20), o que é esperado por ambas as organelas serem derivadas da mesma célula. No entanto, um número considerável de EoSVs foi encontrado em contato direto com os grânulos, evidenciando a íntima relação entre estas duas estruturas mesmo fora da célula. Nós também encontramos EoSVs livres próximas e em contato com feixes de colágeno (Figura 21), células da matriz dos tecidos (Figuras 22 e 23), e aos depósitos extracelulares de cromatina (Figuras 23 e 24). As proporções de EoSVs próximas às estruturas analisadas são similares, comparando as duas doenças estudadas, indicando um possível padrão de distribuição, mesmo em condições distintas. A maior diferença observada está relacionada com a proximidade de feixes de colágeno (Figura 21 B e C), no entanto essa diferença possivelmente se dá pela característica da matriz extracelular dos tecidos e não por uma diferença na citólise. Neste trabalho, apenas identificamos a presença e distribuição destas vesículas no meio extracelular,

ainda não sabemos se elas apresentam alguma função quando liberadas pela citólise. No entanto, a proximidade e aparente interação das EoSVs principalmente com outras células e com as ETs, nos dá indícios de suas possíveis funções. As EoSVs livres talvez sirvam como carreadores extracelulares de produtos do eosinófilo, realizando algum tipo de comunicação celular, ou podem até mesmo serem atuantes nas ações que as armadilhas de DNA do eosinófilo têm nas doenças. Caso comprovada alguma função fora da célula, as EoSVs poderiam até mesmo serem consideradas como uma nova subpopulação de vesículas extracelulares.

Os eosinófilos já foram mostrados como sendo capazes de secretarem os dois subtipos mais comuns de vesículas extracelulares, exossomos (derivados dos corpos multivesiculares) e microvesículas (que brotam a partir da membrana plasmática) (Mazzeo *et al.*, 2015; Akuthota *et al.*, 2016; Cañas *et al.*, 2017). As EoSVs liberadas pela citólise seriam uma nova modalidade de vesículas extracelulares exclusivas do eosinófilo. Observamos uma relação destas EoSVs livres com eosinófilos e plasmócitos em ambas as doenças. Caso as EoSVs no meio extracelular tenham um papel na comunicação celular isso poderia indicar uma possível regulação autócrina em eosinófilos, o que já foi mostrado para exossomos (Cañas *et al.*, 2017), e reforçaria o crescente papel que a interação entre eosinófilos e plasmócitos vem ganhando na literatura (Fröhlich *et al.*, 2011; Chu e Berek, 2012; Forman *et al.*, 2016). A proximidade com estes tipos celulares, poderia indicar uma proximidade espacial entre eosinófilos e plasmócitos nos infiltrados inflamatórios ou mesmo uma tendência de ocorrência da citólise do eosinófilo próximo a estas células.

A matriz extracelular pode ser um meio que impossibilite a difusão de vesículas extracelulares a longas distâncias, por isso estas são comumente estudadas em fluidos corporais (Yuana *et al.*, 2013). No interior de um vaso sanguíneo no sino nasal de um paciente com RSCE, nós percebemos a presença de grânulos e vesículas livres entremeados às hemácias (Figura 26). Esta foi apenas uma única observação, mas nos chamou a atenção pois a presença de grânulos de eosinófilos livres em vasos sanguíneos foi relatada em escassos estudos (Yamashima *et al.*, 1985; Salvato, 2001), e a capacidade de eosinófilos em sofrerem citólise ainda na corrente sanguínea nunca foi profundamente explorada. Sabendo que a citólise do eosinófilo libera grânulos e vesículas no meio, se este mecanismo de secreção ocorre nesses locais,

a função das EoSVs livres como vesículas extracelulares ganharia mais força, podendo juntamente com os grânulos influenciar sistemicamente na inflamação.

Por fim, percebemos que alguns dos grânulos depositados no meio extracelular apresentavam protrusões de membrana (Figura 26), um sinal ultraestrutural típico do brotamento vesicular. Aliado aos dados de estudos anteriores, que mostraram a inibição da secreção de grânulos livres pela BFA (Neves *et al.*, 2008) e também o íntimo contato de EoSVs e grânulos livres mostrado por nós, levantamos a hipótese de que ao menos parte da secreção de grânulos liberados pela citólise é feita por meio do transporte vesicular. Estudos mais aprofundados são necessários para confirmar se grânulos de eosinófilos retêm a capacidade formadora de vesículas independentemente da célula. Além disso, se esse brotamento realmente ocorre, outro questionamento levando seria se parte das EoSVs encontradas nos tecidos são na verdade derivadas dos próprios grânulos extracelulares. Isto evidenciaria ainda mais a existência de uma subpopulação distinta de vesículas extracelulares derivadas da citólise do eosinófilo.

Em resumo, identificamos características ultraestruturais da ETose nestes eosinófilos, além de relevantes alterações morfológicas em decorrência da morte celular. E principalmente, destacamos uma importante dinâmica extracelular de vesículas na citólise do eosinófilo em doenças inflamatórias, com a formação de vesículas nucleares, a liberação de EoSVs íntegras no tecido, e a possível capacidade dos FEGs de realizarem o brotamento vesicular independentemente da célula. Nossos dados contribuem para o entendimento dos mecanismos usados pelo eosinófilo para propagar a sua resposta mesmo após a morte celular.

7. CONCLUSÕES

- Este trabalho mostra que a citólise convencional e a ETose representam importantes mecanismos de ativação de eosinófilos humanos na rinosinusite crônica eosinofílica e na colite ulcerativa.

- Alterações ultraestruturais nucleares encontram-se associadas à morte citolítica *in vivo* de eosinófilos como a descondensação, delobulação/arredondamento e expansão da cromatina (características da ETose), além de alterações do envelope nuclear caracterizadas pela formação de vesículas e dilatação do espaço perinuclear. Estes ventos foram demonstrados pela primeira vez em eosinófilos humanos.

- EoSVs, vesículas típicas do transporte intracelular de produtos dos grânulos de eosinófilos humanos, permanecem íntegras após a morte citolítica de eosinófilos humanos *in vivo* com potencial implicação funcional *in situ*.

- O processo de ETose leva não apenas à liberação de grânulos íntegros, mas também à liberação de EoSVs associadas com formação de redes de DNA (EETs).

- Baseado em evidências ultraestruturais, propomos que vesículas são geradas *in situ* a partir de grânulos secretores livres, mecanismo através do qual estes grânulos liberariam gradativamente seus conteúdos fora da célula.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVES, S. S. et al. Esophageal remodeling in pediatric eosinophilic esophagitis. **Journal of allergy clinical immunology**, v.119, n.1, p.206-212, 2007.

ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil granule proteins: form and function. **Journal of Biological Chemistry**, v.289, n.25, p.17406-17415, 2014.

ADAMKO, D. J. et al. Ovalbumin sensitization changes the inflammatory response to subsequent parainfluenza infection: eosinophils mediate airway hyperresponsiveness, M2 muscarinic receptor dysfunction, and antiviral effects. **The Journal of experimental medicine**, v.190, n.10, p.1465-1478, 1999.

AHLSTROM-EMANUELSSON, C. et al. Eosinophil degranulation status in allergic rhinitis: observations before and during seasonal allergen exposure. **European Respiratory Journal**, v.24, n.5, p.750-757, 2004.

AKUTHOTA, P. et al. Extracellular microvesicle production by human eosinophils activated by “inflammatory” stimuli. **Frontiers in cell developmental biology**, v.4, p.117, 2016.

ARMENGOT, M.; GARIN, L.; CARDA, C. Eosinophil degranulation patterns in nasal polyposis: an ultrastructural study. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v.23, n.5, p.466-70, Sep-Oct. 2009. doi:10.2500/ajra.2009.23.3357.

AYRES, W. Production of Charcot-Leyden crystals from eosinophils with aerosol MA. **Blood**, v.4, n.5, p.595-602, 1949.

BARROSO, M. V. et al. Structural and Signaling Events Driving Aspergillus fumigatus-Induced Human Eosinophil Extracellular Trap Release. **Frontiers in Microbiology**, v.12, n.274, 2021-February-18. 2021. doi:10.3389/fmicb.2021.633696.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v.303, n.5663, p.1532-1535, 2004.

BUTTERWORTH, A. E.; DAVID, J. R. Eosinophil function. **New England Journal of Medicine**, v.304, n.3, p.154-156, 1981.

CAÑAS, J. A. et al. Exosomes from eosinophils autoregulate and promote eosinophil functions. **Journal of leukocyte biology**, v.101, n.5, p.1191-1199, 2017.

CARMO, L. A. S. et al. Single-cell analyses of human eosinophils at high resolution to understand compartmentalization and vesicular trafficking of interferon-gamma. **Frontiers in immunology**, v.9, p.1542, 2018.

CARMO, L. A. S. et al. CD63 is tightly associated with intracellular, secretory events chaperoning piecemeal degranulation and compound exocytosis in human eosinophils. **Journal of leukocyte biology**, v.100, n.2, p.391-401, 2016.

CARMO, L. A. S. et al. Expression and subcellular localization of the Qa-SNARE syntaxin17 in human eosinophils. **Experimental cell research**, v.337, n.2, p.129-135, 2015.

CARUSO, R. et al. Degranulation patterns of eosinophils in advanced gastric carcinoma: an electron microscopic study. **Ultrastructural pathology**, v.29, n.1, p.29-36, 2005.

CARVALHO, A. T. P. et al. Immunohistochemical study of intestinal eosinophils in inflammatory bowel disease. **Journal of clinical gastroenterology**, v.36, n.2, p.120-125, 2003.

CHEHADE, M. et al. Esophageal subepithelial fibrosis in children with eosinophilic esophagitis. **Journal of pediatric gastroenterology nutrition**, v.45, n.3, p.319-328, 2007.

CHENG, J. F. et al. Dermal eosinophils in atopic dermatitis undergo cytolytic degeneration. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.99, n.5, p.683-92, May. 1997.

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

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

COLOMBEL, J. et al. Activated eosinophils in adult coeliac disease: evidence for a local release of major basic protein. **Gut**, v.33, n.9, p.1190-1194, 1992.

CRIVELLATO, E. et al. Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, Evolutionary Biology**, v.274, n.1, p.778-784, 2003.

CURTIS, C.; OGBOGU, P. Hypereosinophilic syndrome. **Clinical reviews in allergy immunology**, v.50, n.2, p.240-251, 2016.

DE GROOT, L. E. et al. Corticosteroid withdrawal-induced loss of control in mild to moderate asthma is independent of classic granulocyte activation. **Chest**, 2019.

DE RE, V. et al. Galectin-10, eosinophils, and celiac disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1173, n.1, p.357, 2009.

DIAS, F. F. et al. Human eosinophil leukocytes express protein disulfide isomerase in secretory granules and vesicles: ultrastructural studies. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, v.62, n.6, p.450-459, 2014.

DIENER, K. R. et al. Multi-parameter flow cytometric analysis of uterine immune cell fluctuations over the murine estrous cycle. **Journal of reproductive immunology**, v.113, p.61-67, 2016.

DUBUCQUOI, S. et al. Activated eosinophils and interleukin 5 expression in early recurrence of Crohn's disease. **Gut**, v.37, n.2, p.242-246, 1995.

DVORAK, A. Ultrastructural evidence for release of major basic protein-containing crystalline cores of eosinophil granules in vivo: cytotoxic potential in Crohn's disease. **The Journal of Immunology**, v.125, n.1, p.460-462, 1980.

DVORAK, A. et al. Ultrastructural identification of exocytosis of granules from human gut eosinophils in vivo. **International archives of allergy immunology**, v.102, n.1, p.33-45, 1993.

DVORAK, A.; WELLER, P. Ultrastructural analysis of human eosinophils. In: (Ed.). **Human Eosinophils**: Karger Publishers, v.76, 2000. p.1-28.

DVORAK, A. M. et al. Bullous pemphigoid, and ultrastructural study of the inflammatory response: Eosinophil, basophil and mast cell granule changes in multiple biopsies from one patient. **Journal of Investigative Dermatology**, v.78, n.2, p.91-101, 1982.

DVORAK, A. M.; MIHM, M. C.; DVORAK, H. F. Degranulation of basophilic leukocytes in allergic contact dermatitis reactions in man. **The Journal of Immunology**, v.116, n.3, p.687-695, 1976.

DVORAK, H. et al. Morphology of delayed type hypersensitivity reactions in man. I. Quantitative description of the inflammatory response. **Laboratory investigation**, v.31, n.2, p.111-130, 1974.

ECHEVARRÍA, L. U. et al. Evidence of eosinophil extracellular trap cell death in COPD: does it represent the trigger that switches on the disease? **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v.12, p.885, 2017.

EL-HASHIMI, W. Charcot-Leyden crystals: formation from primate and lack of formation from nonprimate eosinophils. **The American journal of pathology**, v.65, n.2, p.311, 1971.

ERJEFÄLT, J. et al. Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. **Thorax**, v.56, n.5, p.341-344, 2001.

ERJEFÄLT, J. et al. Association between inflammation and epithelial damage-restitution processes in allergic airways in vivo. **Clinical Experimental Allergy**, v.27, n.11, p.1344-1355, 1997.

ERJEFÄLT, J. S. et al. Cytolysis and piecemeal degranulation as distinct modes of activation of airway mucosal eosinophils. **Journal of allergy clinical immunology**, v.102, n.2, p.286-294, 1998.

ERJEFALT, J. S. et al. Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. **Thorax**, v.56, n.5, p.341-4, May. 2001.

ERJEFALT, J. S. et al. Allergen-induced eosinophil cytolysis is a primary mechanism for granule protein release in human upper airways. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.160, n.1, p.304-12, Jul. 1999. doi:10.1164/ajrccm.160.1.9809048.

ERJEFALT, J. S.; PERSSON, C. G. New aspects of degranulation and fates of airway mucosal eosinophils. **American journal of respiratory critical care medicine**, v.161, n.6, p.2074-2085, 2000.

FILIPPONE, R. T. et al. Eosinophils in inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v.25, n.7, p.1140-1151, 2019.

FLORES-TORRES, A. S. et al. Eosinophils and respiratory viruses. **Viral Immunology**, v.32, n.5, p.198-207, 2019.

FORMAN, R. et al. Eosinophils may play regionally disparate roles in influencing IgA+ plasma cell numbers during large and small intestinal inflammation. **BMC immunology**, v.17, n.1, p.1-12, 2016.

FRÖHLICH, A. et al. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. **Nature immunology**, v.12, n.2, p.151-159, 2011.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **The Journal of cell biology**, v.176, n.2, p.231-241, 2007.

FUKUDA, T. et al. Calcium ionophore A23187 calcium-dependent cytolytic degranulation in human eosinophils. **The Journal of Immunology**, v.135, n.2, p.1349-1356, 1985.

FULKERSON, P. C.; ROTHENBERG, M. E. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.12, n.2, p.117-29, Feb. 2013. doi:10.1038/nrd3838.

GADGIL, H. S. et al. Proteome of monocytes primed with lipopolysaccharide: analysis of the abundant proteins. **Proteomics**, v.3, n.9, p.1767-1780, 2003.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differentiation**, v.25, n.3, p.486-541, 2018.

GEVAERT, E. et al. Charcot-Leyden crystals promote neutrophilic inflammation in patients with nasal polyposis. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.145, n.1, p.427-430. e4, 2020.

GOH, Y. S. et al. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, n.24, p.9914-9919, 2013.

GONZALEZ, E. B. et al. Ultrastructural and immunohistochemical evidence for release of eosinophilic granules in vivo: cytotoxic potential in chronic eosinophilic pneumonia. **Journal of allergy clinical immunology**, v.79, n.5, p.755-762, 1987.

GOUON-EVANS, V.; LIN, E. Y.; POLLARD, J. W. Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. **Breast Cancer Research**, v.4, n.4, p.1-10, 2002.

GUTIÉRREZ-PEÑA, E. J.; KNAB, J.; BÜTTNER, D. W. Immunoelectron microscopic evidence for release of eosinophil granule matrix protein onto microfilariae of *Onchocerca volvulus* in the skin after exposure to amocarzine. **Parasitology research**, v.84, n.8, p.607-615, 1998.

HAFEZ, I.; STOLPE, A.; LINDAU, M. Compound exocytosis and cumulative fusion in eosinophils. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.45, p.44921-44928, 2003.

HAHM, E. et al. Extracellular protein disulfide isomerase regulates ligand-binding activity of $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ integrin and neutrophil recruitment during vascular inflammation. **Blood**, v.121, n.19, p.3789-3800, 2013.

HENDERSON, W. R.; CHI, E. Ultrastructural characterization and morphometric analysis of human eosinophil degranulation. **Journal of cell science**, v.73, n.1, p.33-48, 1985.

HEREDIA, J. E. et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. **Cell**, v.153, n.2, p.376-388, 2013.

HUANG, L.; APPLETON, J. A. Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes. **Trends in parasitology**, v.32, n.10, p.798-807, 2016.

JEFFERY, P. K. et al. Effects of Treatment on Airway Inflammation and Thickening of Basement Membrane Reticular Collagen in Asthma: A Quantitative Light and

Electron Microscopic Study. **American Review of Respiratory Disease**, v.145, n.4_pt_1, p.890-899, 1992. doi:10.1164/ajrccm/145.4_Pt_1.890.

JUNG, Y. et al. IL-1 β in eosinophil-mediated small intestinal homeostasis and IgA production. **Mucosal immunology**, v.8, n.4, p.930-942, 2015.

KARAWAJCZYK, M. et al. Piecemeal degranulation of peripheral blood eosinophils: a study of allergic subjects during and out of the pollen season. **American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology**, v.23, n.4, p.521-529, 2000.

KENNEDY, J. L.; BORISH, L. Chronic sinusitis pathophysiology: the role of allergy. **American Journal of Rhinology Allergy**, v.27, n.5, p.367-371, 2013.

KHRIZMAN, P. et al. Charcot-Leyden crystals associated with acute myeloid leukemia: Case report and literature review. **Leukemia research**, v.34, n.12, 2010.

KITA, H. Eosinophils: multifunctional and distinctive properties. **International archives of allergy immunology**, v.161, n.Suppl. 2, p.3-9, 2013.

KLION, A. D.; NUTMAN, T. B. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.113, n.1, p.30-37, 2004.

KNUDSEN, U. B. et al. Eosinophils in human cervical ripening. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, v.72, n.2, p.165-168, 1997.

KOURO, T.; TAKATSU, K. IL-5-and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. **International immunology**, v.21, n.12, p.1303-1309, 2009.

LAMPINEN, M. et al. Different regulation of eosinophil activity in Crohn's disease compared with ulcerative colitis. **Journal of leukocyte biology**, v.84, n.6, p.1392-1399, 2008.

LAURINDO, F. R. et al. Novel role of protein disulfide isomerase in the regulation of NADPH oxidase activity: pathophysiological implications in vascular diseases. **Antioxidants redox signaling**, v.10, n.6, p.1101-1114, 2008.

LAURINDO, F. R.; PESCATORE, L. A.; DE CASTRO FERNANDES, D. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. **Free Radical Biology Medicine**, v.52, n.9, p.1954-1969, 2012.

LEE, J. J. et al. Human versus mouse eosinophils: "that which we call an eosinophil, by any other name would stain as red". **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.130, n.3, p.572-584, 2012.

LEIFERMAN, K. M. et al. Dermal deposition of eosinophil-granule major basic protein in atopic dermatitis: comparison with onchocerciasis. **New England Journal of Medicine**, v.313, n.5, p.282-285, 1985.

LEONIDAS, D. D. et al. Crystal structure of human Charcot–Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins. **Structure**, v.3, n.12, p.1379-1393, 1995.

LIU, C. et al. Predictive significance of Charcot–Leyden crystals for eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **American journal of rhinology allergy**, v.33, n.6, p.671-680, 2019.

LOGAN, M. R.; ODEMUYIWA, S. O.; MOQBEL, R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.111, n.5, p.923-32; quiz 933, May. 2003.

LUNA-GOMES, T. et al. Eosinophils as a Novel Cell Source of Prostaglandin D2: Autocrine Role in Allergic Inflammation. **The Journal of Immunology**, v.187, n.12, p.6518-6526, 2011. doi:10.4049/jimmunol.1101806 %J The Journal of Immunology.

MACKENZIE, J. R. et al. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4+ Th2 lymphocyte function. **The Journal of Immunology**, v.167, n.6, p.3146-3155, 2001.

MAKINO, H. et al. Massive eosinophilic infiltration in a patient with the nephrotic syndrome and drug-induced interstitial nephritis. **American journal of kidney diseases**, v.26, n.1, p.62-67, 1995.

MARICHAL, T. et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. **Nature medicine**, v.17, n.8, p.996, 2011.

MAWHORTER, S.; KAZURA, J.; BOOM, W. Human eosinophils as antigen-presenting cells: relative efficiency for superantigen-and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation. **Immunology**, v.81, n.4, p.584, 1994.

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

MCBRIEN, C. N.; MENZIES-GOW, A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. **Frontiers in Medicine**, v.4, n.93, 2017-June-30. 2017. doi:10.3389/fmed.2017.00093.

MCLAREN, D. J.; MACKENZIE, C.; RAMALHO-PINTO, F. Ultrastructural observations on the in vitro interaction between rat eosinophils and some parasitic helminths (*Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis* and *Nippostrongylus brasiliensis*). **Clinical & Experimental Immunology**, v.30, n.1, p.105, 1977.

MEHTA, P.; FURUTA, G. T.; CLINICS, A. Eosinophils in gastrointestinal disorders: eosinophilic gastrointestinal diseases, celiac disease, inflammatory bowel diseases, and parasitic infections. **Immunology and Allergy Clinics**, v.35, n.3, p.413-437, 2015.

MELO, R. C. N.; DVORAK, A.; WELLER, P. F. Electron tomography reveals 3D structure of secretory organelles in eosinophils. **Microscopy Analysis**, v.117, p.15, 2007.

MELO, R. C. N.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Electron tomography and immunogold electron microscopy for investigating intracellular trafficking and secretion in human eosinophils. **Journal of cellular molecular medicine**, v.12, n.4, p.1416-1419, 2008a.

MELO, R. C. N.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Contributions of electron microscopy to understand secretion of immune mediators by human eosinophils. **Microscopy microanalysis**, v.16, n.6, p.653, 2010a.

MELO, R. C. N.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Contributions of electron microscopy to understand secretion of immune mediators by human eosinophils. **Microscopy & microanalysis**, v.16, n.6, p.653, 2010b.

MELO, R. C. N.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Eosinophil ultrastructure. **Eosinophils in health disease**, v.1, p.20-27, 2012.

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

MELO, R. C. N. et al. Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. **Traffic**, v.6, n.10, p.866-879, 2005a.

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

MELO, R. C. N. et al. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. **Traffic**, v.6, n.11, p.1047-1057, 2005b.

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

MELO, R. C. N. et al. Galectin-10, the protein that forms Charcot-Leyden crystals, is not stored in granules but resides in the peripheral cytoplasm of human eosinophils. **Journal of leukocyte biology**, 2020. doi:10.1002/jlb.3ab0220-311r.

MELO, R. C. N.; WELLER, P. F. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. **Histology histopathology**, v.25, n.10, p.1341, 2010.

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

METZLER, K. D. et al. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. **Cell reports**, v.8, n.3, p.883-896, 2014.

MUKHERJEE, M. et al. Sputum autoantibodies in patients with severe eosinophilic asthma. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.141, n.4, p.1269-1279, 2018.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M.; BARBOSA-MARQUES, S.; JUNQUEIRA JR, L. Morphological changes in eosinophils are reliable markers of the severity of an acute asthma exacerbation in children. **Allergy**, v.68, n.7, p.911-920, 2013.

MUNIZ, V. S. et al. Eosinophils release extracellular DNA traps in response to *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.141, n.2, p.571-585. e7, 2018.

MUNIZ, V. S.; WELLER, P. F.; NEVES, J. S. Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond. **Journal of leukocyte biology**, v.92, n.2, p.281-288, 2012.

NEBENFÜHR, A.; RITZENTHALER, C.; ROBINSON, D. G. Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. **Plant physiology**, v.130, n.3, p.1102-1108, 2002.

NEUBERT, E. et al. Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. **Nature communications**, v.9, n.1, p.1-13, 2018.

NEVES, J. S. et al. Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, n.47, p.18478-83, Nov 25. 2008. doi:10.1073/pnas.0804547105.

NEVES, J. S.; RADKE, A. L.; WELLER, P. F. Cysteinyl leukotrienes acting via granule membrane-expressed receptors elicit secretion from within cell-free human eosinophil granules. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.125, n.2, p.477-482, 2010.

NEVES, J. S.; WELLER, P. F. Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology. **Current opinion in immunology**, v.21, n.6, p.694-699, 2009.

NIRMALA, J. G.; LOPUS, M. J. C. B.; TOXICOLOGY. Cell death mechanisms in eukaryotes. **Cell biology toxicology** v.36, n.2, p.145-164, 2020.

NYENHUIS, S. M. et al. Charcot–Leyden crystal protein/galectin-10 is a surrogate biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthma. **Biomarkers in medicine**, v.13, n.9, p.715-724, 2019.

OHASHI, Y. et al. Airway hyperresponsiveness, increased intracellular spaces of bronchial epithelium, and increased infiltration of eosinophils and lymphocytes in bronchial mucosa in asthma. **American Review of Respiratory Disease**, v.145, n.6, p.1469-1476, 1992.

OHTA, N. et al. ETosis-derived DNA trap production in middle ear effusion is a common feature of eosinophilic otitis media. **Allergology International**, v.67, n.3, p.414-416, 2018.

OMOKAWA, A. et al. Mucus plugging in allergic bronchopulmonary aspergillosis: implication of the eosinophil DNA traps. **Allergology International**, v.67, n.2, p.280-282, 2018.

PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **The Journal of cell biology**, v.191, n.3, p.677-691, 2010.

PERSSON, C. Primary lysis of eosinophils in severe desquamative asthma. **Clinical Experimental Allergy**, v.44, n.2, p.173-183, 2014.

PERSSON, C.; ULLER, L. Theirs but to die and do: primary lysis of eosinophils and free eosinophil granules in asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.189, n.6, p.628-33, Mar 15. 2014. doi:10.1164/rccm.201311-2069OE.

PERSSON, C. G.; ERJEFALT, J. S. Eosinophil lysis and free granules: an in vivo paradigm for cell activation and drug development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.18, n.4, p.117-23, Apr. 1997a.

PERSSON, C. G.; ERJEFALT, J. S. "Ultimate activation" of eosinophils in vivo: lysis and release of clusters of free eosinophil granules (Cfegs). **Thorax**, v.52, n.6, p.569-74, Jun. 1997b.

PERSSON, E. K. et al. Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment. **Science**, v.364, n.6442, p.eaaw4295, 2019.

PERTIWI, K. R. et al. Extracellular traps derived from macrophages, mast cells, eosinophils and neutrophils are generated in a time-dependent manner during atherothrombosis. **The Journal of pathology**, v.247, n.4, p.505-512, 2019.

PILIPONSKY, A. M. et al. Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation. **Molecular immunology**, v.38, n.16-18, p.1369-1372, 2002.

PILSCZEK, F. H. et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v.185, n.12, p.7413-7425, 2010.

PIZZICHINI, M. et al. Sputum in severe exacerbations of asthma: kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. **American journal of respiratory critical care medicine**, v.155, n.5, p.1501-1508, 1997.

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

RADKE, A. L. et al. Mature human eosinophils express functional Notch ligands mediating eosinophil autocrine regulation. **Blood**, v.113, n.13, p.3092-3101, 2009.

RAO, R. R. et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. **Cell**, v.157, n.6, p.1279-1291, 2014.

RODRÍGUEZ-ALCÁZAR, J. F. et al. Charcot–Leyden crystals activate the NLRP3 inflammasome and cause IL-1 β inflammation in human macrophages. **The Journal of Immunology**, v.202, n.2, p.550-558, 2019.

ROGERS, D. F. Mucoactive agents for airway mucus hypersecretory diseases. **Respiratory Care**, v.52, n.9, p.1176-1197, 2007.

ROSENBERG, H. F.; DOMACHOWSKE, J. B. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. **Journal of Leukocyte Biology**, v.70, n.5, p.691-698, 2001.

ROSENBERG, H. F.; DYER, K. D.; FOSTER, P. S. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v.13, n.1, p.9-22, 2013.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annual Reviews in Immunology**, v.24, p.147-174, 2006.

RUBIO, C. A. A method for the detection of eosinophilic granulocytes in colonoscopic biopsies from IBD patients. **Pathology-Research Practice**, v.199, n.3, p.145-150, 2003.

SAFFARI, H. et al. Electron microscopy elucidates eosinophil degranulation patterns in patients with eosinophilic esophagitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.133, n.6, p.1728-34 e1, Jun. 2014. doi:10.1016/j.jaci.2013.11.024.

SALVATO, G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. **Thorax**, v.56, n.12, p.902-906, 2001.

SAMARASINGHE, A. E. et al. Eosinophils promote antiviral immunity in mice infected with influenza A virus. **The Journal of Immunology**, v.198, n.8, p.3214-3226, 2017.

SCEPEK, S.; MOQBEL, R.; LINDAU, M. Compound exocytosis and cumulative degranulation by eosinophils and their role in parasite killing. **Parasitology Today**, v.10, n.7, p.276-278, 1994.

SCHAEFER, H.; HÜBNER, G.; FISCHER, R. Spezifische mikrogranula in eosinophilen. **Acta haematologica**, v.50, n.2, p.92-104, 1973.

SHAH, S. A.; ISHINAGA, H.; TAKEUCHI, K. Pathogenesis of eosinophilic chronic rhinosinusitis. **Journal of inflammation**, v.13, n.1, p.1-9, 2016.

SHI, H. Z. Eosinophils function as antigen-presenting cells. **Journal of leukocyte biology**, v.76, n.3, p.520-527, 2004.

SILVA, J. D. C. et al. Neutrophil and Eosinophil DNA Extracellular Trap Formation: Lessons From Pathogenic Fungi. **Frontiers in Microbiology**, v.12, p.318, 2021.

SPENCER, L. A. et al. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. **Frontiers in immunology**, v.5, p.496, 2014.

SPENCER, L. A. et al. Cytokine receptor-mediated trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.9, p.3333-3338, 2006.

SU, J. A brief history of Charcot-Leyden crystal protein/galectin-10 research. **Molecules**, v.23, n.11, p.2931, 2018.

TAKEDA, M. et al. Hypereosinophilic syndrome with abundant Charcot-Leyden crystals in spleen and lymph nodes. **Asia Pacific allergy**, v.10, n.3, p.e24-e24, 2020. doi:10.5415/apallergy.2020.10.e24.

THROSBY, M. et al. CD11c+ eosinophils in the murine thymus: developmental regulation and recruitment upon MHC class I-restricted thymocyte deletion. **The Journal of Immunology**, v.165, n.4, p.1965-1975, 2000.

TIMMONS, B. C.; FAIRHURST, A.-M.; MAHENDROO, M. S. Temporal changes in myeloid cells in the cervix during pregnancy and parturition. **The Journal of immunology**, v.182, n.5, p.2700-2707, 2009.

TOYODA, M. et al. Free eosinophil granules in urticaria: a correlation with the duration of wheals. **The American journal of dermatopathology**, v.18, n.1, p.49-57, 1996.

TROCME, S. D. et al. Conjunctival deposition of eosinophil granule major basic protein in vernal keratoconjunctivitis and contact lens-associated giant papillary conjunctivitis. **American journal of ophthalmology**, v.108, n.1, p.57-63, 1989.

TURANO, C. et al. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. **Journal of cellular physiology**, v.193, n.2, p.154-163, 2002.

UEKI, S. et al. Eosinophil extracellular trap cell death–derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.137, n.1, p.258-267, 2016.

UEKI, S. et al. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. **Blood**, v.121, n.11, p.2074-2083, 2013.

UEKI, S. et al. Charcot-Leyden crystals in eosinophilic inflammation: active cytolysis leads to crystal formation. **Current allergy asthma reports**, v.19, n.8, p.35, 2019.

UEKI, S. et al. Charcot-Leyden crystal formation is closely associated with eosinophil extracellular trap cell death. **Blood**, v.132, n.20, p.2183-2187, 2018.

ULLER, L. et al. Occurrence of apoptosis, secondary necrosis, and cytolysis in eosinophilic nasal polyps. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v.170, n.7, p.742-747, 2004.

VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M. et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. **Blood**, v.111, n.6, p.3070-3080, 2008.

WARTHA, F.; HENRIQUES-NORMARK, B. ETosis: a novel cell death pathway. **Science Signaling**, v.1, n.21, p.pe25-pe25, 2008.

WATANABE, K. et al. Cytolysis of eosinophils in nasal secretions. **Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology**, v.112, n.2, p.169-173, 2003.

WEILER, C. R. et al. Eosinophil viability during immunoglobulin-induced degranulation. **Journal of leukocyte biology**, v.60, n.4, p.493-501, 1996.

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

WILLEBRAND, R.; VOEHRINGER, D. IL-33-induced cytokine secretion and survival of mouse eosinophils is promoted by autocrine GM-CSF. **PloS one**, v.11, n.9, p.e0163751, 2016.

WOODRUFF, S. A. et al. Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases. **Journal of pediatric gastroenterology nutrition**, v.52, n.6, p.650-661, 2011.

WRIGHT, B. L.; LEIFERMAN, K. M.; GLEICH, G. J. Eosinophil granule protein localization in eosinophilic endomyocardial disease. **New England Journal of Medicine**, v.365, n.2, p.187-188, 2011.

WU, D. et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**, v.332, n.6026, p.243-247, 2011.

WU, D. et al. Charcot-Leyden crystal concentration in nasal secretions predicts clinical response to glucocorticoids in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.144, n.1, p.345-348. e8, 2019.

YAMASHIMA, T.; KUBOTA, T.; YAMAMOTO, S. Eosinophil degranulation in the capsule of chronic subdural hematomas. **Journal of neurosurgery**, v.62, n.2, p.257-260, 1985.

YIPP, B. G. et al. Dynamic NETosis is carried out by live neutrophils in human and mouse bacterial abscesses and during severe gram-positive infection. **Nature medicine**, v.18, n.9, p.1386, 2012.

YOUSEFI, S. et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. **Nature medicine**, v.14, n.9, p.949, 2008.

YOUSEFI, S. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death Differentiation**, v.16, n.11, p.1438-1444, 2009.

YUANA, Y.; STURK, A.; NIEUWLAND, R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. **Blood reviews**, v.27, n.1, p.31-39, 2013.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **Physiology**, v.19, n.3, p.124-128, 2004.