



KENNEDY BONJOUR DE OLIVEIRA FERREIRA

**AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS PROCESSOS DE GRANULOGÊNESE,
SECREÇÃO E DO PERFIL MITOCONDRIAL DURANTE A DIFERENCIAÇÃO E ATIVAÇÃO
DE EOSINÓFILOS**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Novembro/2019

Kennedy Bonjour de Oliveira Ferreira

**AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS PROCESSOS DE GRANULOGÊNESE,
SECREÇÃO E DO PERFIL MITOCONDRIAL DURANTE A DIFERENCIAÇÃO E
ATIVAÇÃO DE EOSINÓFILOS**

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador (a): Dra. Rossana Correa Netto de Melo

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Novembro/2019

043

Ferreira, Kennedy Bonjour de Oliveira.

Avaliação ultraestrutural dos processos de granulogênese e secreção e do perfil mitocondrial durante a diferenciação e ativação de eosinófilos [manuscrito] / Kennedy Bonjour de Oliveira Ferreira. - 2019.

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

Orientador (a): Dra. Rossana Correa Netto de Melo.

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

1. Biologia Celular. 2. Eosinófilos/secreção. 3. Mitocôndrias. 4. Tomografia com Microscopia Eletrônica. 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

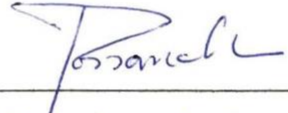

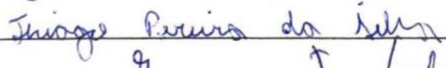
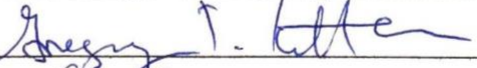
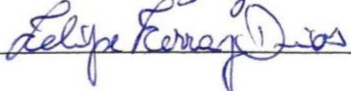
**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
KENNEDY BONJOUR DE OLIVEIRA FERREIRA**

220/2019
entrada
2º/2015
2015747987

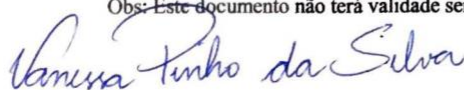
Às **quinze horas** do dia **29 de novembro de 2019**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS PROCESSOS DE GRANULOGÊNESE E SECREÇÃO E DO PERFIL MITOCONDRIAL DURANTE A DIFERENCIAÇÃO E ATIVAÇÃO DE EOSINÓFILOS**", requisito final para obtenção do grau de Doutor 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	APROVADO
Dra. Giselle Santos Magalhães	Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais	Aprovado
Dr. Thiago Pereira da Silva	UFJF	APROVADO
Dr. Gregory Thomas Kitten	UFMG	APROVADO
Dr. Felipe Ferraz Dias	UFMG	APROVADO

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, 29 de novembro de 2019.**

Dr^a. Rossana Correa Netto de Melo (Orientadora) 
Dr^a. Giselle Santos Magalhães 
Dr. Thiago Pereira da Silva 
Ph.D. Gregory Thomas Kitten 
Dr. Felipe Ferraz Dias 

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



Prof. Vanessa Pinho da Silva
Sub-Coordenadora do Programa de
Pós Graduação em Biologia Celular ICB/UFMG

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, sob a orientação da Prof^a. Dra. Rossana Correa Netto de Melo, com auxílio financeiro do CNPq.

Dedico à minha
família.

AGRADECIMENTOS

Durante os quatro anos na produção desses resultados, aqui consagrados com apenas um terço do real, houve pessoas no meu caminho que me deram apoio, incentivo e inspiração.

Primeiramente, agradeço à minha orientadora Rossana CN Melo por ter apoiado minhas decisões, dado espaço a minha criatividade, ter cedido espaço a minhas hipóteses e por ter buscado incansavelmente recursos financeiros para o andamento deste estudo. A ela minha eterna gratidão!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e FAPEMIG pelo apoio financeiro

À banca examinadora desta tese que se dispôs e a contribuir de forma efetiva e científica.

À Dra Christianne Bandeira Melo, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela colaboração, discussão e carinho com minhas idas ao Rio.

À Dr. Hélio Chiarini e Fernanda Almeida, da Universidade Federal de Minas Gerais, por ter aberto as portas do seu laboratório e tornado a minha segunda casa.

À Dra Josiane Neves, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por colaborar me receber em seu laboratório para os experimentos em eosinófilos humanos.

À equipe do Centro de Microscopia da UFMG, pela colaboração e contribuição no processamento do material de microscopia eletrônica. Em especial ao Dr. Greg Kitten por ter me dado apoio na empreitada da tomografia. ao Ney Sampaio por ter a paciência e gentileza de ficar horas comigo desvendando o SerialEM e entre outras longas análises. À Dra Patrícia Massara, pela atenção e suporte a qualidade dos meus materiais. À técnica Marilene, pelos infinitos corte para alcançarmos a tomo perfeita.

Ao Dr Gustavo Menezes e Dra Máisa Antunes, pelas ajudas e incansáveis buscas de eosinófilos murinos no Confocal.

À Dra Vivian Vasconcelos e suas estudantes Ingrid e Michelle pela colaboração nas análises.

À Dra Jualiana Estanislau e sua estudante Bruna Fernandes pelas análises no FloJow.

À minha família, que mesmo longe, me senti acolhido e especial quando em muitas dificuldades estavam prontos para mim. Em especial, à minha mãe Maria Angélica, como dizia Carlos Drumond de Andrade, "Mãe, na sua graça, é eternidade." Com seu olhar sereno e cauteloso, derramava sobre mim, sua admiração.

Ao meu pai Paulo César por ter buscado entender e ouvir assuntos complexos e responder com simplicidade. Às minhas irmãs, Kenya e Kellem que mesmo não tendo a oportunidade que eu tive, conseguiram conquistar seus méritos e, carinhosamente, admiram o meu.

Ao meu sobrinho Heitor, por ter agraciado minha vida com sua arte e alegria.

Às minhas avós Nadir e Layzir, por ter dado tanto carinho e amor nas minhas idas evindas.

Aos meus queridos amigos da vida de lab, especialmente a Thiago Silva e Victor

Kersten qual me acompanhou e me ajudou em várias etapas do meu doutoramento.

Thiago que teve tanta atenção em minhas dúvidas e Victor qual foi peça fundamental para minha vida no Rio.

Ainda no lab, agradeço imensamente pelo companheirismo e apoio do Vitor Neves e Cinthia Palazzi, têm se tornado pessoas admiráveis e amigas. Aos meus amigos do lab da UFJF, Kássia, Vitor e Juliana por serem co-participativos do entusiasmo deste estudo.

Aos meus amigos do lab da UFMG, Fernando Felicione, André Brant, Thaís Garcia, Wiviane Assis e Thaís Merici quais dividimos boas risadas e excelentes discussões, me receberam com muito carinho em Belo Horizonte.

Aos amigos da UFJR Mia, Charles, Rafael, Renata, Camila e Nathalia pelo companheirismo e carinho as idas ao Rio.

Às minhas primas Karla Olga e Karoline Ferreira, com seu amor incondicional e divisões fraternas aventuras, sonhos, emoções e muito afeto.

Aos primos, Juan, Ian, Yasmin, Isabela, Izadora, Camille, Isabelle, Júlia, Karine, Bernard, Pedrinho e Liz que me encham de carinho e que eu adoro “atazanar”.

Aos meus tios e tias, Marise Amélia, Cristiane, Edelma, Sônia (Sônia Tereza), Adélia, Alessandra e Sandro pelo apoio em todas as idas e chegadas nas cidades que eu me movava, pelo carinho e risadas em todos os momentos, sem exceções.

Aos meus amigos João, Aluir, Carnelutti, Felipe que eu não tenho palavras e nem papel suficiente para descrever o quanto eles são queridos para mim.

Aos meus amigos-irmãos, Alana, Mônica, Amanda, Lara, Verimar, Andreza, e Bruno que em nossa afinidade e amor, construído com um carinho inexplicável, resultou em uma história linda de amizade. Todo apoio, horas de conversas, tantas e tantas risadas juntas com vocês... É combustível para qualquer aventura ou desafio na minha vida.

A Deus, pela força, fé e foco que me manteve firme na busca dos meus objetivos e nas etapas necessárias para minha formação como pesquisadora, em especial a conclusão desta tese

“Não quero a faca, nem queijo, quero é fome.”

- Adélia Prado

RESUMO

O eosinófilo, célula do sistema imune inato, desempenha papel importante em condições de saúde e doença através de sua notável capacidade secretora. Ao longo de seu desenvolvimento, os eosinófilos pré-sintetizam dezenas de proteínas e as armazenam em grânulos secretores, chamados grânulos específicos. Citocinas como o fator de célula tronco (SCF) e Interleucina-5 (IL-5) são envolvidas na diferenciação do eosinófilo. No entanto, muito pouco se conhece sobre o processo de formação do grânulo (granulogênese) e os processos subjacentes do desenvolvimento do eosinófilo. Neste trabalho investigamos o processo de granulogênese, de secreção e o perfil mitocondrial durante o desenvolvimento e ativação de eosinófilos em condições experimentais. No presente trabalho, foram aplicadas técnicas avançadas de microscopia tal como, eletrônica de transmissão (MET) ou tomografia eletrônica em eosinófilos murinos e humanos. Para isso, células da medula óssea foram coletadas de camundongos para estabelecimento de um sistema de cultura *ex vivo* de eosinófilos. Eosinófilos em processo de diferenciação foram avaliados em diferentes fases da cultura (0,4,8, 10, 12 e 14 dias) enquanto eosinófilos maduros foram estimulados com SCF, eotaxina-1 (CCL11) ou fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α). Em paralelo, eosinófilos humanos isolados do sangue e estimulados *in vitro* com SCF e eosinófilos teciduais, sob o tratamento com SCF *in situ*, foram investigados por MET para identificação de seus processos de secreção. Aqui, nós identificamos que apenas 12% dos eosinófilos gerados na cultura apresentavam grânulos no processo final de maturação. Após a suplementação de SCF na cultura, foi possível alcançar um aumento de 100% na população de eosinófilos com grânulos maduros. Durante a diferenciação de eosinófilos murinos, encontramos grânulos sofrendo processos de condensação e cristalização de conteúdo, os quais levam à forma madura da organela, caracterizada pela presença de grânulos com núcleo cristalino. Estudos em 3D revelaram, pela primeira vez, a presença de membranas intragranulares formando estruturas tubulares durante o processo de condensação dos grânulos, o que evidencia a complexidade estrutural dessas organelas. Além disso, mostramos que mitocôndrias de eosinófilos murinos reduzem à medida que a célula amadurece e são capazes de liberar vesículas a partir da membrana externa. Na presença de SCF, CCL11 e TNF- α grânulos dos eosinófilos secretaram através do mecanismo piecemeal e as mitocôndrias sofreram dilatação e perda de cristas. Quando diretamente estimulados com apenas SCF, eosinófilos murinos maduros foram capazes de secretar IL-6, mas não IL-4 ou IL-13. Em eosinófilos humanos ativados por SCF em condições *in vitro*, nós detectamos que o mecanismo de secreção prevalente foi a piecemeal (transporte vesicular de seus produtos). No entanto, quando administrada em no tecido subcutâneo de pacientes, biópsias de pele exibiam grande fluxo de eosinófilos com perfil citolítico, característica principal do mecanismo de citólise (morte da célula com deposição de grânulos nos tecidos). Além disso, nós observamos por meio da reconstrução 3D que grânulos depositados no tecido liberado por eosinófilos em citólise são hábeis a realizar liberação de vesículas tubulares (vesículas sombrero – EoSVs) a no meio extracelular, indicando uma habilidade de vesiculação ainda não identificada anteriormente. Nossos dados demonstram que tanto os grânulos específicos quanto o perfil mitocondrial de eosinófilos passam por processos dinâmicos ao longo da maturação da célula e são aptos a responderem à ativação celular dependendo do estímulo.

Palavras-chaves: eosinófilo, desenvolvimento celular, secreção, mitocôndria, tomografia eletrônica

ABSTRACT

Eosinophil, an innate immune cell, plays an important role in both health and disease through its remarkable secretory capacity. Along their development, eosinophils pre-synthesize dozens of proteins and store in secretory granules called specific granules. Cytokines such as, Stem Cell Factor (SCF) and Interleukin-5 (IL-5) are involved in eosinophil differentiation. However, little is known about the process of eosinophil granulogenesis, and the action of SCF under these cells. In the present work, conventional transmission electron microscopy (MET) or electron tomography techniques were applied to investigate the processes of granulogenesis and secretion and mitochondrial profile during eosinophil differentiation and activation. Thus, bone marrow cells were collected from mice to establish an *ex vivo* eosinophil culture system. Differentiating eosinophils were evaluated at different stages of culture (0, 4, 8, 10, 12 and 14 days) while mature eosinophils were stimulated with SCF, eotaxin-1 (CCL11) or tumor necrosis factor- α (TNF- α). In parallel, human eosinophils isolated from blood and stimulated *in vitro* with SCF and tissue eosinophils under the effect of *in situ* SCF treatment were investigated by MET to identify their secretory processes. Only 12% of the cells had mature granules on day 14 of culture. With SCF supplementation, a 100% of the mature eosinophil population was achieved. During differentiation of murine eosinophils, the specific granules undergo condensation and crystallization processes, which lead to the mature form, characterized by the presence of crystalloid granules. 3D studies revealed for the first time the presence of intragranular membranes forming tubular structures during the condensation process of specific granules, which demonstrates the structural complexity of these organelles. In parallel, murine eosinophil mitochondria reduce along cell matures and release vesicles from the outer membrane. In the presence of inflammatory agonists, mitochondria undergo swelling and loss of cristae. When directly stimulated with SCF, mature murine eosinophils were able to secrete IL-6, but not IL-4 or IL-13. SCF-stimulated human eosinophils degranulate by piecemeal (vesicular transport of their products) or cytolysis (cell death with deposition of granules in tissues). In addition, they release tubular vesicles (Sombrero vesicles - EoSVs) from free granules in the extracellular medium, indicating an unrecognized vesiculation ability. Our data demonstrate that both specific granules and mitochondrial profile of eosinophils undergo dynamic processes throughout cell maturation and can respond to cellular activation with morphological changes.

Keywords: eosinophil, cell development, secretion, mitochondria, electron tomography

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BMEos	Eosinófilos derivados da medulla óssea
CCL11/Eotaxin-1	<i>CC-chemokine ligand 11</i>
CCL5/RANTES	<i>CC-chemokine ligand 5</i>
EoSV	Vesícula sombrero de eosinófilo (<i>Eosinophil Sombrero Vesicle</i>)
ECP	Proteína catiônica do eosinófilo
EDN	Neurotoxina derivado do eosinófilo
EPX	Peroxidase de eosinófilo (também conhecida como EPO)
Flt3L	<i>FMS-like tyrosine kinase 3 ligand</i>
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MBP	Proteína básica principal
PAF	Fator ativador de plaquetas
PMD	Desgranulação por piecemeal
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNases	Ribonucleases
SCF	Fator de célula tronco
TNF- α	Fator de necrose tumoral - alfa

LISTA DE FIGURAS & TABELA

Figura 1 – Micrografia eletrônica de transmissão de um eosinófilo humano.....	11
Figura 2 – Morfologia do desenvolvimento de grânulos específicos eosinófilos humanos.....	8
Figura 3 – Avanços recentes em nossa compreensão do desenvolvimento de eosinófilos, diversidade de subconjuntos e função nos tecidos periféricos.	11
Figura 4 –Mecanismos de secreção de eosinófilos	20
Figura 5 – Desenho experimental das culturas de eosinófilos derivados da medula óssea	28
Figura 6 – Células obtidas do lavado de medula óssea de animais Balb/C foram mantidas em cultura por 14 dias na presença de FLT3l, SCF e IL-5 para diferenciação de eosinófilos (BMEos)	37
Figura 7 – Características ultraestruturais de eosinófilos murinos imaturos e maduros	38
Figura 8 – Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) e complexo de Golgi em eosinófilos murinos em cultura.....	39
Figura 9 – Ultraestrutura dos grânulos específicos de eosinófilos murinos em cultura.....	42
Figura 10 – Biogênese dos grânulos secretores do eosinófilo murino	43
Figura 11 – Reconstrução em 3D do sistema membranoso intragranular dos grânulos imaturos SGI	44
Figura 12 – Efeito do SCF sobre eosinófilos murinos.....	46
Figura 13 – Eosinófilos humanos estimulados ou não por SCF.....	49
Figura 14 – Eosinófilos humanos estimulados com SCF aumentam o número de EoSVs.....	50
Figura 15 – Eletromicrografia de biópsias de pele humana coletadas do local de administração de rhSCF	52
Figura 16 – EoSVs e grânulos secretores livres no espaço extracelular, observados na pele de pacientes em tratamento <i>in situ</i> com SCF	54
Figura 17 – Análises tomográficas revelam formação de EoSVs a partir de grânulos livres em sítios inflamatórios	55
Figura 18 – Área mitocondrial diminui ao longo do desenvolvimento de eosinófilos murinos.....	57
Figura 19 – Elétron tomografia revela que mitocôndria em eosinófilos imaturos libera vesículas derivadas da membrana externa	58
Figura 20 – Mitocôndrias de eosinófilos murinos respondem aos estímulos inflamatórios.....	59

Figura 21– Elétron tomografia revela diminuição de cristas em eosinófilos murinos estimulados.
.....60

Tabela 1: Tipo e número de Amostras processadas para MET com detalhes do procedimento de fixação 31

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Eosinófilo e sua diferenciação.....	15
1.2. Proteínas pré-formadas nos grânulos e suas propriedades	21
1.3. Mecanismos de secreção de eosinófilos	24
Exocitose	25
Citólise	27
1.4. Fator de célula tronco (SCF) em processos de diferenciação e ativação de eosinófilos	29
1.5. Aspectos mitocondriais	30
1.6. Justificativas	32
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. Objetivo Geral.....	34
2.2. Objetivos Específicos.....	34
2 MATERIAIS E MÉTODOS	35
22 Animais, eutanásia e coleta de amostras	35
23 Cultura de eosinófilos derivados da medula óssea (BMEos) de murinos	35
23.2 Cultura de BMEOs com suplementação contínua de SCF.....	36
23.3 Acompanhamento da diferenciação das BMEos ao longodas culturas	37
23.4 Estimulação de eosinófilos murinos diferenciados nasculturas.....	37
24 Isolamento de eosinófilos humanos do sangue periférico	38
25 Estimulação de eosinófilos humanos isolados	38
26 Quantificação da liberação de Proteína Catiônica do Eosinófilo	38
27 Biópsias de pele humana de locais com injeção subcutânea derhSCF.....	38
28 Microscopia Confocal	39
29 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	39
2.10 Tomografia eletrônica e reconstrução 3D.....	41
2.11 Análises Ultraestruturais	41
2.11.2 Avaliação ultraestrutural de processos secretores de eosinófiloshumanos sob efeito de SCF in vitro e in vivo. 42	42
2.11.3 Aspectos ultraestruturais das mitocondrial de eosinófilos murinos durante o desenvolvimento e ativação celular.....	43
2.12 Análises estatísticas	43
3 RESULTADOS.....	44
3.1 Caracterização dos eosinófilos derivados da medula óssea	44

3.2	Aspectos ultraestruturais da granulogênese em eosinófilos derivados da medula óssea.....	47
3.3	Grânulos imaturos contêm um sistema membranoso interno.....	49
3.4	A suplementação da cultura com SCF gera mais grânulos maduros	53
3.5	Eosinófilos murinos em cultura ativados por SCF secretam citocinas.....	56
3.6	Eosinófilos humanos do sangue periférico estimulados por SCF secretam ECP e desgranulam por PMD 56	
3.7	Injeções subcutâneas de SCF induzem citólise e PMD em eosinófilos humanos teciduais	50
3.8	Grânulos secretores depositados no sítio inflamatório liberam EoSVs.....	52
3.9	O processo de maturação de eosinófilos murinos leva à redução da população mitocondrial	54
3.10	Mitocôndrias de eosinófilos respondem a estímulos inflamatórios com alterações morfológicas.....	54
4	DISCUSSÃO	59
5	CONCLUSÕES	66
6	REFERÊNCIAS	67
	PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS ELABORADOS DURANTE O DOUTORADO	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Eosinófilo e sua diferenciação

Eosinófilos desempenham papel importante como células tanto efetoras como imunomoduladoras em doenças alérgicas, na defesa contra patógenos e na regulação de tecidos (Weller; Spencer, 2017). Enquanto a maioria das células necessitam produzir e liberar proteínas via maquinaria do complexo de Golgi-RER (*síntese de novo*), eosinófilos sintetizam diversas proteínas durante sua diferenciação e as estocam em grânulos secretores para liberá-las rapidamente em situações inflamatórias [revisado em (Spencer, L. A.; Bonjour, K.; Melo, R.C.N.; Weller, P. F., 2014)]. Desta forma, eosinófilos são consideradas células secretoras especializadas, capazes de liberar proteínas pré-formadas. Os grânulos de eosinófilos armazenam dezenas de proteínas, incluindo proteínas catiônicas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento [revisado em (Davoine; Lacy, 2014; Spencer, L. A.; Bonjour, K.; Melo, R. C.; Weller, P. F., 2014; Weller; Spencer, 2017)].

Estudos sobre as rotas secretoras de eosinófilos vêm sendo realizados com a utilização de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), a qual permite observar, em alta resolução, detalhes dos processos de secreção e suas características morfológicas (Melo et al., 2010). Com o uso de MET, é possível acompanhar a formação e detectar alterações estruturais de organelas importantes para as atividades funcionais do eosinófilo, em especial, dos grânulos secretores. Estes grânulos, quando maduros, têm morfologia única, caracterizada pela presença de um núcleo cristalino elétron-denso (cristaloide) imerso em uma matriz elétron-lúcida (Figura 1). Um corpo grande de evidências mostra que eosinófilos contêm apenas uma população de grânulos secretores, também denominados grânulos específicos [revisado em (Melo & Weller, 2018)].

Durante a diferenciação de eosinófilos a partir de células progenitoras de granulócitos, eosinófilos imaturos (mielócitos) apresentam elevado número de grânulos em processo de condensação (grânulos imaturos) culminando com a formação de grânulos maduros contendo cristaloide (Figura 2). Sob ativação, estes grânulos mudam drasticamente sua ultraestrutura (Figura 2). (Melo & Weller, 2018). No entanto, o processo de granulogênese de eosinófilos, especialmente de eosinófilos murinos ainda é pouco compreendido.

Ao longo do seu desenvolvimento, eosinófilos apresentam a co-expressão conjunta dos fatores de transcrição da família *CCAAT/enhancer-bind protein* (C/EBP), E-twenty-six (ETS), PU.1 e GATA. Através de elegante estudo de expressão de gene ectópico, demonstrou-se que o destino dos eosinófilos representa um equilíbrio combinatório entre o limiar do nível de expressão desses fatores de transcrição, porém uma sutil ruptura deste equilíbrio pode levar à linhagem mielóide ou eritróide (AKASHI; TRAVER; MIYAMOTO; WEISSMAN, 2000; BLANCHET; MCNAGNY, 2009). No entanto, esses fatores de transcrição (GATA, ETS, C/EBP), também regulam a expressão de genes específicos do eosinófilo (Figura 3).

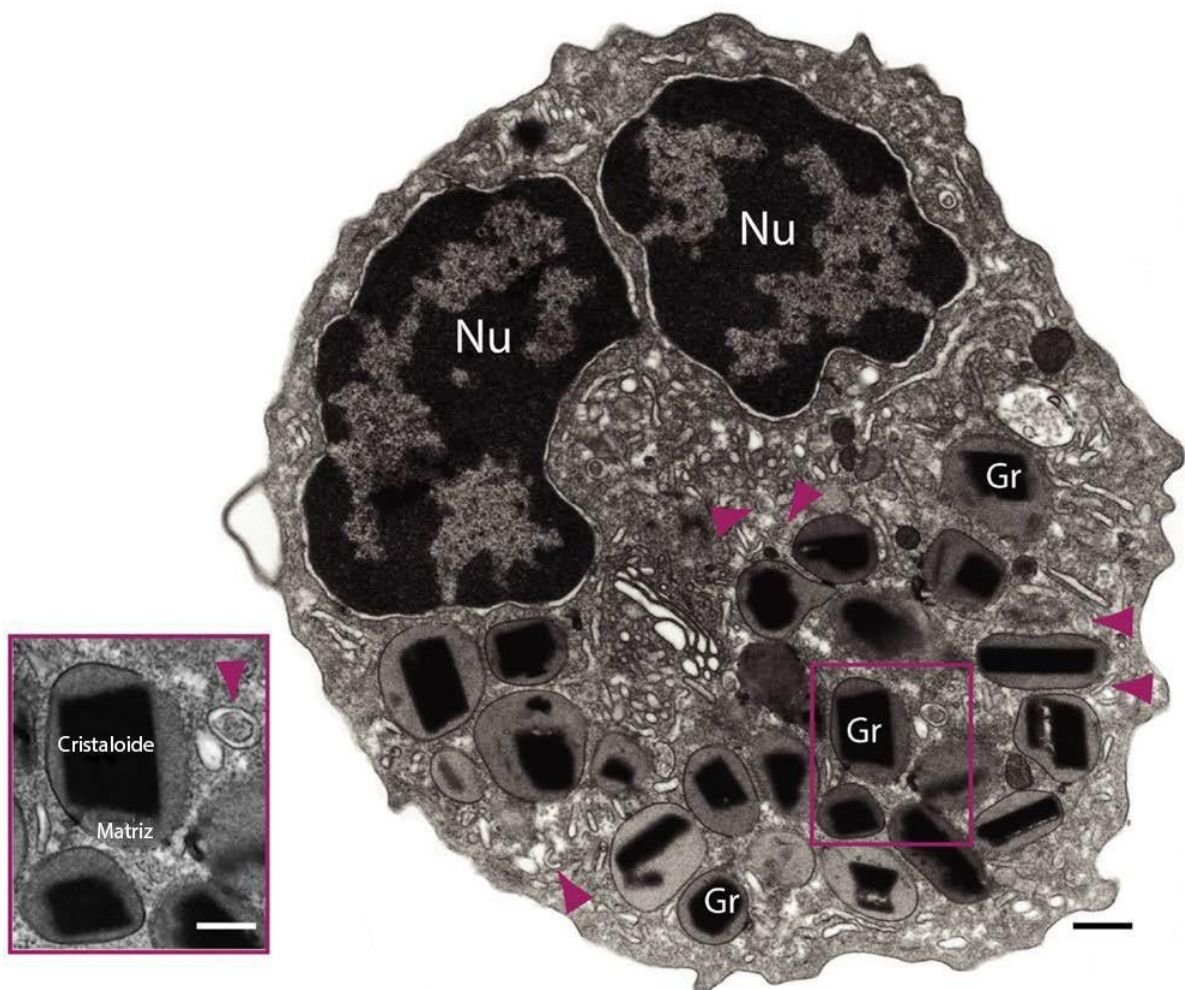


Figura 1. Micrografia eletrônica de transmissão de um eosinófilo humano. Esta célula é caracterizada por uma população de grânulos específicos (Gr) citoplasmáticos, os quais apresentam morfologia única – um cristalóide interno eléttron-denso, circundado por matriz menos eléttron-densa. Cabeças de seta indicam vesículas sombrero de eosinófilos (EoSvs). Figura reproduzida de Spencer et al., 2014.

Em particular, sítios *double* GATA, são característicos de vários genes promotores no eosinófilo, como exemplo de *Gata 1* (vistos em camundongos) e genes codificando a subunidade alfa do receptor de interleucina-5 (IL5RA), *proteoglycan 2 bone marrow/eosinophil granule major basic protein* (PRG2/MBP) e o receptor 3 de quimiocina (CCR3) (Rothenberg; Hogan, 2006). A expressão destes fatores muda de acordo com a maturação dos eosinófilos. Estudos posteriores têm demonstrado como essas complexas interações regulam o comprometimento, diferenciação e maturação da linhagem dos eosinófilos (Uhm; Kim; Chung, 2012).

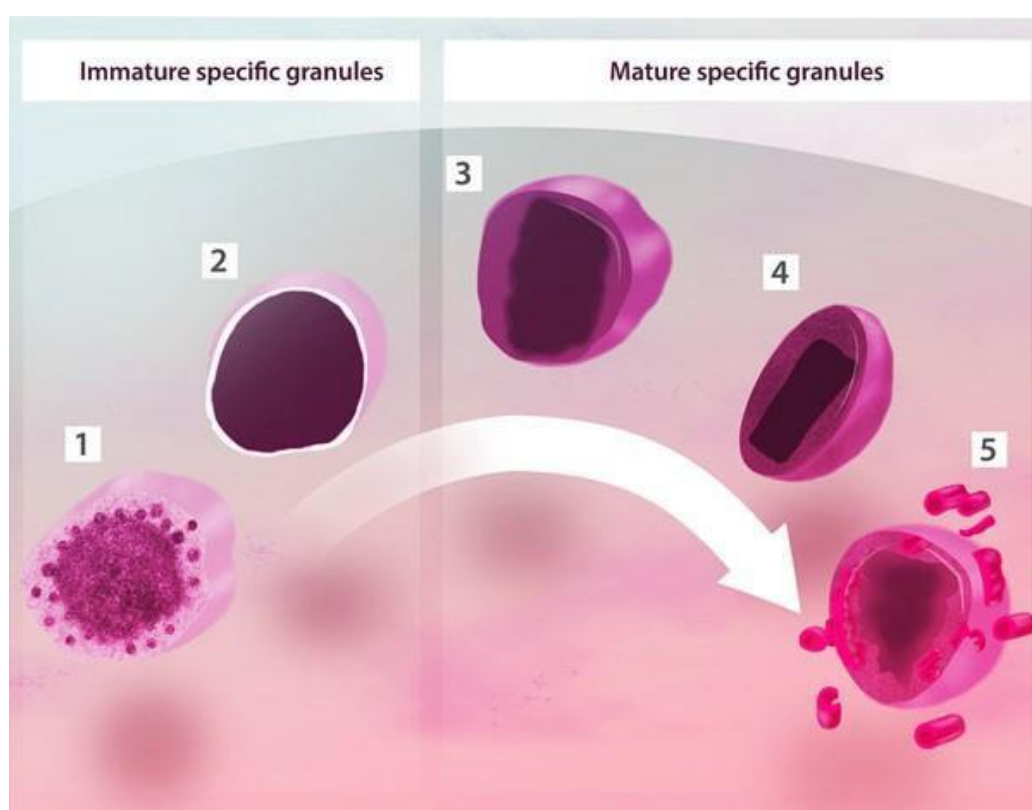


Figura 2- Morfologia do desenvolvimento de grânulos específicos de eosinófilos humanos. Durante a maturação na medula óssea, grânulos específicos imaturos sofrem condensação e cristalização de seus conteúdos. (1) Grânulo imaturo em processo de condensação mostrando vesículas intragranulares circundando o conteúdo denso; (2) Grânulo imaturo redondo com conteúdo homogeneamente denso; (3) Grânulo esférico visto com uma área central elétron-densa circundada por região menos densa; (4) Grânulo elíptico em repouso com núcleo elétron-denso bem definido (cristaloide) e matriz elétron-lúcida; (5) Um grânulo ativado mostrando desestruturação de seu cristaloide e matriz e formação estruturas de vesiculotubulares (EoSvs). Todos os grânulos são delimitados por uma membrana de bicamada fosfolipídica. Figura reproduzida de Melo & Weller, 2018.

Estudos voltados para entender a importância da Proteína Básica Principal (MBP) em respostas asmáticas, utilizaram camundongos *knock-out* para o gene MBP-1 para avaliar o grau de comprometimento do eosinófilo com a patologia. Os resultados demonstram que o modelo estudado não desenvolveu os sinais patológicos

encontrados na asma, tal como recrutamento de células e alterações histopatológicas (DENZLER; FARMER; CROSBY; BORCHERS *et al.*, 2000; MACIAS; WELCH; DENZLER; LARSON *et al.* 2000). Além disso, quando camundongos *knock-out* do gene de peroxidase de eosinófilo (EPX) (foram desafiados com alérgeno, não obtiveram resultados de resolução ou de inibição de fatores de desenvolvimento de asma, concluindo que estas duas moléculas participam das respostas inflamatórias em atividades combinadas (Denzler; Borchers; Crosby; Cieslewicz *et al.*, 2001). Interessantemente, quando camundongos foram duplamente deficientes nestas proteínas (MBP-1^{-/-} e EPX^{-/-}), resultou em animais altamente específicos para eosinofiloiose, com perfil de eosinófilos imaturos, sugerindo que estas proteínas são intrinsicamente participantes no processo de granulogênese destas células [(ACKERMAN, 2013) e revisado por (ACHARYA; ACKERMAN, 2014)].

Uma vez comprometidos com a linhagem, eosinófilos progenitores iniciam o processo de fabricação das proteínas a serem armazenadas nos grânulos secretores. Assim, outros fatores de transcrição são envolvidos para a produção e checagem dessas proteínas. Recentemente estudos têm destacado um novo ponto da regulação da biogênese dos grânulos secretores e sua relação com a diferenciação e a sobrevivência dos eosinófilos (WILLEBRAND; VOEHRINGER, 2017). O fator de transcrição *X-box binding protein 1* (XBP1) é geralmente associado a células altamente secretoras, como células plasmáticas, células Paneth ou células acinosas pancreáticas, e desempenha um papel na regulação da resposta de proteínas mal enovelada (UPR) por promover a transcrição de genes que codificam fatores de resposta ao estresse. Entretanto, foi mostrado que, ao bloquear XBP1 durante a diferenciação do eosinófilo, ocorre interrupção da formação de grânulos, prejudicando a maturação da célula e causando apoptose (BETTIGOLE; GLIMCHER, 2016).

Outro fato importante é a participação de receptores de citocinas, tal como GM-CSF, IL-3 e IL-5 conhecidos por desempenharem um papel importante na maturação e na função efetoras do eosinófilo humano (KOURO; TAKATSU, 2009). Dentre estas citocinas, a IL-5 é a proteína mais específica à eosinófilos, devido a sua seletiva expressão de IL-5R α , e de fato muito do entendimento dos fatores de transcrição que governam a diferenciação celular tem sido obtido a partir de análises do gene que codifica este receptor (KOURO; TAKATSU, 2009).

A expressão de dois marcadores da membrana, CD34⁺ e IL-5RA são usados para definir e distinguir os progenitores comprometidos com a linhagem de eosinófilos (EoPs) dos demais leucócitos. Em asmáticos, uma frequência aumentada dos marcadores CD34⁺ e IL-5RA⁺ é correlacionada com aumento da produção de eosinófilos maduros e com a expansão de EoPs (Chapter 5 - Eosinophilopoiesis, 2013). Além disso, estudos mostraram que CD34 é expresso em eosinófilos maduros sobre condições inflamatórias, apresentando importante papel na migração destas células tanto, na asma quanto na colite ulcerativa (BLANCHET; MALTBY; HADDON; MERKENS *et al.*, 2007; MALTBY; WOHLFARTH; GOLD; ZBYTNUIK *et al.*, 2010).

Ao longo da última década, estudos utilizando eosinófilos murinos diferenciados da medula óssea (BMEos) têm permitido a avaliação de diferentes aspectos da biologia molecular dessas células, possibilitando novas estratégias imuno-farmacológicas (DYER, KIMBERLY D.; MOSER, JENNIFER M.; CZAPIGA, MEGGAN; SIEGEL, STEVEN J. *et al.*, 2008b; FULKERSON; ROTHENBERG, 2018). Para a diferenciação *in vitro* de eosinófilos murino, é necessária a presença de citocinas como ligante de tirosina quinase-3 tipo FMS (Flt3L), fator de célula tronco (SCF) e IL-5, descritas como primordiais para a proliferação e maturação dessas células (DYER, KIMBERLY D.; MOSER, JENNIFER M.; CZAPIGA, MEGGAN; SIEGEL, STEVEN J. *et al.*, 2008a). Citocinas como SCF e Flt3L potencializam a maturação de granulócitos e a IL-5 promove a diferenciação de eosinófilos (DYER, KIMBERLY D.; MOSER, JENNIFER M.; CZAPIGA, MEGGAN; SIEGEL, STEVEN J. *et al.*, 2008b). Em cultura, os primeiros dias da diferenciação de BMEos, SCF e Flt3L são adicionados em meio RPMI para iniciar o processo de formação dos eosinófilos e de suas principais organelas (LYMAN; JACOBSEN, 1998; SAKABE; KIMURA; ZENG; MINAMIGUCHI *et al.*, 1998).

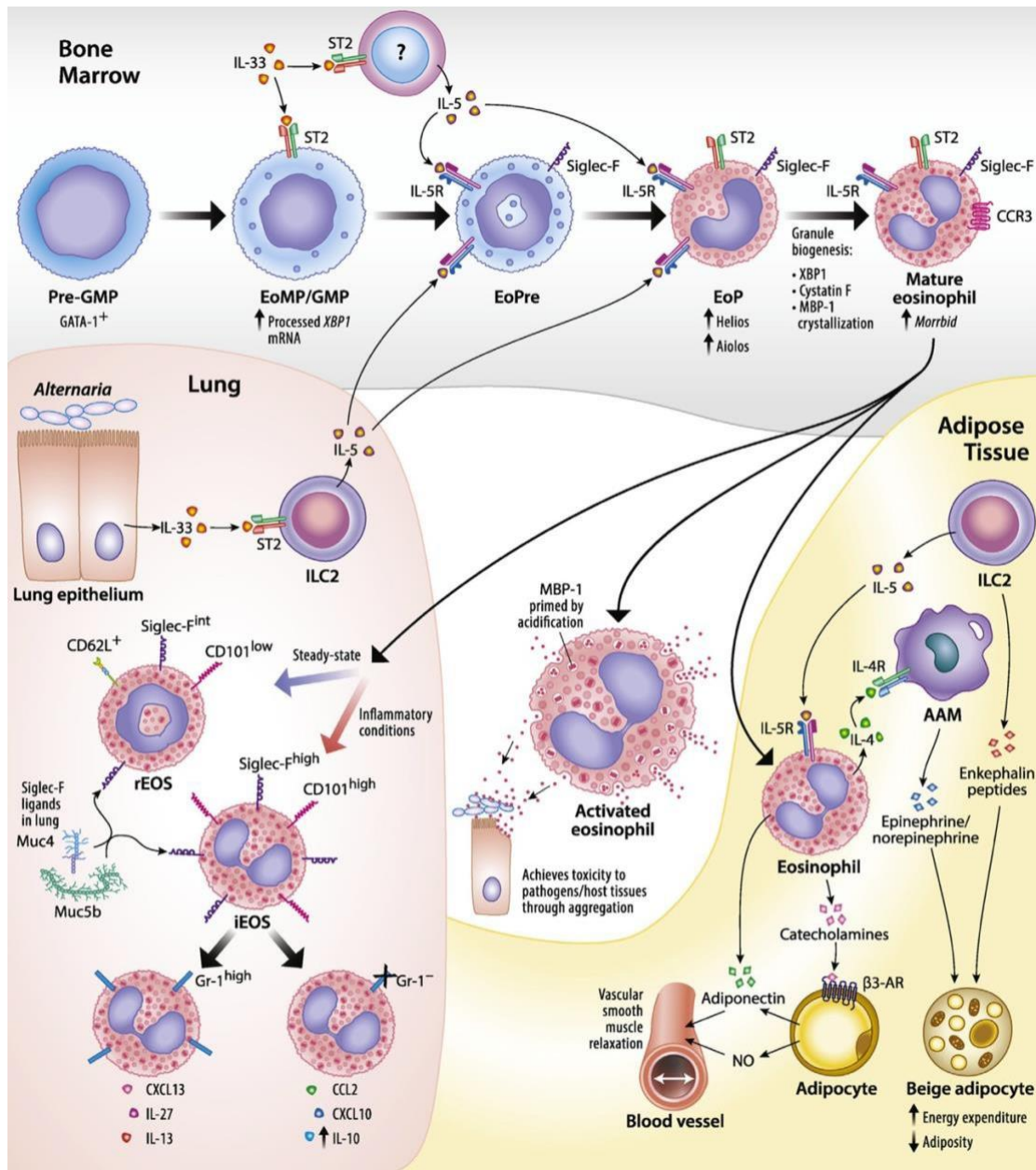


Figura 3- Desenvolvimento de eosinófilos e suas funções em tecidos periféricos. Os eosinófilos se desenvolvem a partir de GATA-1 pré-GMPs na medula óssea. Esses pré-GMPs dão origem a GMPs, os quais em camundongos respondem à IL-33 através do receptor ST2, que promove o desenvolvimento de eosinófilos e a expressão do receptor a IL-5 a (IL-5Ra). As GMPs expressam níveis mais altos de mRNA de XBP1 processado, o que é essencial para posterior desenvolvimento. GMPs dão origem a precusores de eosinófilos de camundongo Siglec-F^{int}IL-5Ra1 (EoPres). Além disso, a IL-33 promove o desenvolvimento de eosinófilos, induzindo a expressão de IL-5 de outras células da medula óssea, atuando em EoPres e EoPs, que seguem EoPres no desenvolvimento de linhagem. As EoPs expressam níveis mais altos de Helios e Aiolos, membros da família Ikaros de fatores de transcrição, que podem desempenhar um papel na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento dos eosinófilos e permanecem altamente expressos nos eosinófilos maduros de camundongos. A maturação adequada dos grânulos requer expressão do fator de transcrição XBP1, inibição da atividade da protease de cisteína pela cistatina F e cristalização da proteína do grânulo MBP-1 em uma forma não tóxica. A maturação inadequada dos grânulos pode levar à perda da viabilidade celular e ao bloqueio do desenvolvimento de eosinófilos. Figura reproduzida de: {O'Sullivan, 2018}.

1.2. Proteínas pré-formadas nos grânulos e suas propriedades

Durante e após o processo de maturação dos eosinófilos, inúmeros mediadores imunes de natureza proteica são formados nestas células. A maquinaria da produção desses compostos, em progenitores de eosinófilos, segue o modelo clássico de fabricação de proteínas, com o processamento nos retículos endoplasmáticos e empacotamento pelo complexo de Golgi (LODISH; BERK; ZIPURSKY; MATSUDAIRA *et al.*, 2000). No entanto, após estas etapas, o eosinófilo passa a armazenar proteínas em grânulos secretores, tornando-se uma célula com características particulares dentre a maioria dos leucócitos. Estas proteínas pré-formadas nos grânulos específicos de eosinófilos são cruciais durante as respostas imunes e em condições fisiopatológicas (revisado em Melo *et al.*, 2013; Spencer *et al.*, 2014). Desta forma, eosinófilos são aptos a responderem prontamente à diversas situações, liberando rapidamente moléculas armazenadas nos grânulos (revisado em Melo *et al.*, 2013; Spencer *et al.*, 2014).

O interior dos grânulos contém uma variedade de moléculas que podem ser liberadas através de diversos mecanismos de secreção em respostas à eventos inflamatórios. Dentre estas moléculas encontram-se proteínas catiônicas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento com um amplo espectro de atividades funcionais desde atividade efetora até regulação, reparação e remodelamento envolvido no funcionamento do sistema imune (Weller & Spencer, 2017).

Proteínas catiônicas

As seguintes proteínas catiônicas são encontradas nos grânulos secretores: EPX (também conhecida como EPO), MBP-1 e sua homóloga MBP-2 (GLEICH; LOEGERING; MALDONADO, 1973; PLAGER; LOEGERING; WEILER; CHECKEL *et al.*, 1999; PLAGER; STUART; GLEICH, 1998) e ribonucleases (RNases)- RNase2 (conhecida como neurotoxina derivado do eosinófilo-EDN) (DURACK; ACKERMAN; LOEGERING; GLEICH, 1981; GORDON, 1933) e RNase3 (proteína catiônica do eosinófilo-ECP) (GLEICH; LOEGERING; BELL; CHECKEL *et al.*, 1986).

MBP-1 e MBP-2 apresentam propriedades similares conforme demonstrado em estudos *in vitro*, podendo realizar danos e morte às células, indução da formação de superperóxidos e IL-8 a partir de neutrófilos e mastócitos e liberação de histamina e leucotrienos por basófilos. No entanto, a MBP-1 é considerada mais potente do que MBP-2, em eosinófilos humanos estimulados *in vitro*. [revisado por (ACHARYA;

ACKERMAN, 2014; GLEICH; ADOLPHSON; LEIFERMAN, 1993)]. MBP-1, também referida simplesmente como MBP ou PRG2, é a forma mais estudada desta proteína e encontra-se armazenada no cristalóide dos grânulos específicos (Melo & Weller, 2018).

EPO é uma proteína abundante da matriz dos grânulos secretores, a qual usa seus peróxido de hidrogênio como um substrato oxidante para gerar espécies oxidante, incluindo ácidos hipohalosos (ACHARYA; ACKERMAN, 2014; ROTHENBERG; HOGAN, 2006). Mediante a condições inflamatórias, estas proteínas são liberadas dos eosinófilos, exercendo alguns efeitos citotóxicos como uma toxina catiônica, sendo hábil a levar a morte de parasitos e outras células de mamíferos. Além disso, a EPO pode exercer funções tanto anti-inflamatória quanto pró-inflamatória (HENDERSON; JÖRG; KLEBANOFF, 1982; LOCKSLEY; WILSON; KLEBANOFF, 1982; PARK; MYERS; MARZELLA, 1992).

EDN e ECP são ribonucleases pertencentes à superfamília das ribonucleases A, com eficiência enzimática comparável às ribonucleases pancreáticas bovinas, capazes de gerar ribonucleotídeos de ácido insolúvel a partir do substrato de ácido polimérico insolúvel (ACHARYA; ACKERMAN, 2014).

A EDN, conhecida também como ribonuclease 2, possui propriedades neurotóxicas e citotóxicas. Embora tenha sido descoberta e inicialmente nomeada como neurotoxina, a EDN é também expressa constitutivamente no tecido hepático humano e a sua expressão pode ser induzida em macrófagos por estímulos pró-inflamatórios (BLANCHARD; ROTHENBERG, 2009; HEIDEMANN; FIORE; SOOD; HAM, 2010; JONSSON; BLOM; STALENHEIM; HAKANSSON *et al.*, 2014; NEWTON; NICHOLLS; RYBAK; YOULE, 1994; PLAGER; DAVIS; ANDREWS; COENEN *et al.*, 2009).

A ECP, conhecida como ribonuclease 3, possui propriedades citotóxicas e neurotóxicas. Esta proteína é considerada mais catiônica do que EDN, com grande toxicidade para uma variedade de helmintos, hemoflagelados, bactérias, vírus de RNA de fita única e ao tecido do hospedeiro (DOMACHOWSKE, J. B.; DYER, K. D.; ADAMS, A. G.; LETO, T. L. *et al.*, 1998; LACY; ROSENBERG; WALSH, 2014; ROSENBERG, 1998; TOPIC; DODIG, 2011). Os níveis de ECP são usados como dados clínicos associadas ao eosinófilo, avaliados em doenças de caráter alérgico como a asma e correlacionados com o grau de severidade da doença e atividade inflamatória dos eosinófilos (JUNG; KANG; LEE; PARK *et al.*, 2014; PARK; OH; KIM; YOON *et al.*, 2014; RAMAROKOTO; KILDEMOES; RANDRIANASOLO; RAVONIARIMBININA *et al.*, 2014; TEDESCHI; MARZANO; LORINI; BALICE *et al.*, 2014).

A atividade anti-bacteriana e a toxicidade anti-parasitária são consideradas maiores na ECP em comparação com a EDN. Em estudo *in vitro*, a ECP pode ser um agente antiviral, participando da defesa da infecção causada pelo vírus RSV, com a participação de exo- e endonucleases clivando o RNA de fita única (DOMACHOWSKE, JOSEPH B.; DYER, KIMBERLY D.; ADAMS, ANTHONY G.; LETO, THOMAS L. *et al.*, 1998). Vários trabalhos demonstraram que níveis baixos de ECP podem diminuir a infectividade viral (ACHARYA; ACKERMAN, 2014; BOIX; SALAZAR; TORRENT; PULIDO *et al.*, 2012; BYSTROM; AMIN; BISHOP-BAILEY, 2011; PULIDO; TORRENT; ANDREU; NOGUES *et al.*, 2013)

Citocinas, Quimiocinas e Fatores de crescimento

Diferente das células T e B, eosinófilos são capazes de liberar rapidamente citocinas armazenadas em grânulos secretores em resposta à estímulos. Apesar de eosinófilos estarem geralmente em associação com a imunidade Th2, estas células podem expressar Th1, Th2 e citocinas regulatórias, assim como citocinas com fortes propriedade pro- ou anti-inflamatória. Assim, existe uma lista de cerca de 35 mediadores derivados dos eosinófilos (DAVOINE; LACY, 2014; HOGAN; ROSENBERG; MOQBEL; PHIPPS *et al.*, 2008; LACY; MOQBEL, 2000; LACY; ROSENBERG; WALSH, 2014), com destaque para CCL5/RANTES (LACY; MAHMUDI-AZER; BABLITZ; HAGEN *et al.*, 1999), CCL11/eotaxina-1 (NAKAJIMA; YAMADA; IIKURA; MIYAMASU *et al.*, 1998), GM-CSF (LEVI-SCHAFFER; LACY; SEVERS; NEWMAN *et al.*, 1995), IL-2 (LEVI-SCHAFFER; BARKANS; NEWMAN; YING *et al.*, 1996), IL-4 (MELO, R. C.; SPENCER, L. A.; PEREZ, S. A.; GHIRAN, I. *et al.*, 2005; MOLLER; DE JONG; VAN DER KWAST; OVERBEEK *et al.*, 1996; MOQBEL; YING; BARKANS; NEWMAN *et al.*, 1995), IL-5 (DESREUMAUX; JANIN; COLOMBEL; PRIN *et al.*, 1992; MOLLER; DE JONG; OVERBEEK; VAN DER KWAST *et al.*, 1996), IL-6 (HAMID; BARKANS; MENG; YING *et al.*, 1992), IL-13 (SPENCER; SZELA; PEREZ; KIRCHHOFFER *et al.*, 2009; WOERLY; LACY; YOUNES; ROGER *et al.*, 2002), TNF- α (BEIL; WELLER; TZIZIK; GALLI *et al.*, 1993) e TGF- α (EGESTEN; CALAFAT; KNOL; JANSSEN *et al.*, 1996), os quais se encontram pré-formados nos grânulos.

Algumas quimiocinas, como CCL11 e CCL5, podem sustentar o recrutamento e manutenção de eosinófilos e linfócitos durante a inflamação alérgica. RANTES ativa a via intracelular de íons de cálcio, conseqüentemente, levando à desgranulação e

promovendo a liberação de superóxidos, seguida da quimiotaxia. CCL11, é uma quimiocina específica de eosinófilo fornecendo sinais na quimiotaxia desta célula. É considerada uma das mais importantes quimiocinas durante o processo alérgico, pois além de exercer o comportamento intracelular similar a CCL5, pode mobilizar Ca^+ e realizar o *buster* respiratório, sugerindo um comportamento autócrino (ELSNER; HOCHSTETTER; KIMMIG; KAPP, 1996; TENSCHER; METZNER; SCHOPF; NORGAUER *et al.*, 1996).

Eosinófilos secretam GM-CSF, molécula criticamente importante em manter a viabilidade e a função efetora desta célula durante respostas inflamatórias. Em paralelo, IL-4 tem sido extensivamente estudada em inflamações alérgicas, possui um papel importante na manutenção da resposta Th2 e pode estimular células B na produção de isotipos de IgE (FULKERSON; ROTHENBERG, 2018). A IL-4 tem vários papéis na inflamação alérgica, como indução da quimiotaxia de eosinófilos, aumento da capacidade secretora destas células e estímulo para adesão e migração de leucócitos através da promoção do aumento de IgE e da expressão de molécula de adesão de célula vascular (VCAM) em células endoteliais [revisado por (HOGAN; ROSENBERG; MOQBEL; PHIPPS *et al.*, 2008)].

Similar à IL-4, a IL-5 é muito investigada em repostas alérgicas inflamatórias. Esta citocina é essencial para diferenciação de eosinófilos de progenitores CD34^+ derivados da medula óssea (SHALIT; SEKHSARIA; MALECH, 1995; YAMAGUCHI; SUDA; SUDA; EGUCHI *et al.*, 1988). A IL-5 possui inúmeros efeitos em eosinófilos, incluindo o prolongamento da sobrevivência, indução da quimiotaxia, *priming*, e desgranulação em respostas a agonistas.

A IL-13 tem funções em doenças das vias respiratórias como a asma, atuando na fibrose pulmonar e ativação de metaloproteases. Além da participação na resposta alérgica pulmonar, esta proteína é também requerida em infecções helmínticas experimentais, com potencial função protetora contra parasitos (URBAN; NOBENTRAUTH; DONALDSON; MADDEN *et al.*, 1998; WILLS-KARP; LUYIMBAZI; XU; SCHOFIELD *et al.*, 1998; ZHENG; ZHU; WANG; HOMER *et al.*, 2000).

1.3. Mecanismos de secreção de eosinófilos

Em média, cada eosinófilo possui cerca de 300-400 grânulos específicos em seu citoplasma (HARTMANN; SCEPEK; LINDAU, 1995; HENDERSON; CHI, 1985), estocando uma quantidade expressiva de proteínas e mediadores lipídicos que são liberados para o meio extracelular durante respostas alérgicas, inflamatórias e

imunoreguladoras. Três processos de secreção são identificados em eosinófilos: exocitose, desgranulação por *piecemeal* e citólise (Figura 4).

Exocitose

A exocitose clássica de grânulos ocorre através de uma série de eventos altamente regulados: (a) mobilização ou translocação de grânulos para a periferia da célula; (b) ligação do grânulo com a membrana plasmática; (c) acoplamento entre o grânulo e a membrana plasmática; (d) fusão das membranas e liberação do mediador (LOGAN; LACY; BABLITZ; MOQBEL, 2002). Exocitose composta ocorre quando os grânulos se fundem entre si formando um canal com posterior fusão com a membrana plasmática (SPENCER, L. A.; BONJOUR, K.; MELO, R. C. N.; WELLER, P. F., 2014) (Figura. 4).

Em estudos co-culturas foi visualizada a interação de eosinófilos com alguns parasitos (*Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*, ou *Nippostrongylus brasiliensis*) com evidências ultraestruturais de exocitose e liberação de conteúdos derivados dos grânulos na superfície dos parasitos (MCLAREN; MACKENZIE; RAMALHO-PINTO, 1977). Outras observações *in vitro* mostraram a exocitose de eosinófilos sob estímulos com IgA e IgG (WEILER; KITA; HUKKEE; GLEICH, 1996) e guanosina 5'-O-[gama-tio]trifosfato (GTP γ S) (HAFEZ; STOLPE; LINDAU, 2003). Investigações usando técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura mostraram que o ionóforo A23187 induz à exocitose dos grânulos em eosinófilos (HENDERSON; CHI, 1985; HENDERSON; CHI; JORG; KLEBANOFF, 1983). Além disso, análises ultraestruturais também demonstraram que o fungo *Alternaria* induz eosinófilos humanos à desgranulação através da fusão de grânulos entre si (exocitose composta) (INOUE; MATSUWAKI; SHIN; PONIKAU *et al.*, 2005; SPENCER, L. A.; BONJOUR, K.; MELO, R. C. N.; WELLER, P. F., 2014) (Figura. 4).

Desgranulação por *piecemeal*

O mecanismo de desgranulação por *piecemeal* (PMD) foi primeiramente proposto há 30 anos atrás, através de observações ultraestruturais feitas em basófilos (DVORAK; DICKERSIN; CONNELL; CAREY *et al.*, 1976; MELO; LIU; XENAKIS; SPENCER, 2013). Este mecanismo tem sido considerado um importante processo secretor, tanto em células do sistema imune (eosinófilos, mastócitos e basófilos) quanto em células endócrinas (CRIVELLATO; NICO; MALLARDI; BELTRAMI *et al.*, 2003; MELO; WELLER, 2010). Atualmente sabe-se que este fenômeno é o mais frequente em eosinófilos podendo ser estudado *in vitro*, na exposição a estímulos fisiológicos (Melo e

cols., 2005a).

Dentre as evidências ultraestruturais de PMD incluem-se alterações na morfologia dos grânulos secretores como: desorganização do núcleo cristalóide, redução da elétron-densidade, perda do conteúdo da matriz e do núcleo cristalóide, aumento de volume do grânulo e perda total do conteúdo do grânulo, mantendo-se, no entanto, a membrana limitante do mesmo (Figura 4). Além disso, o esvaziamento do grânulo ocorre em paralelo com a formação de EoSVs, as quais brotam dos grânulos e transportam os produtos de secreção (MELO, R. C.; PEREZ, S. A.; SPENCER, L. A.; DVORAK, A. M. *et al.*, 2005; MELO; SPENCER; DVORAK; WELLER, 2008; SPENCER, L. A.; BONJOUR, K.; MELO, R. C.; WELLER, P. F., 2014)

As Alterações estruturais nos grânulos secretores associadas com PMD são descritas em diversas desordens alérgicas e inflamatórias, incluindo a asma (Karawajczyk e cols., 2000), polipose nasal (Erjefalt e cols., 2001, Armengot e cols., 2009), rinite alérgica (Erjefalt e cols., 2001, Ahlstrom-Emanuelsson e cols., 2004); colite ulcerativa (Erjefalt e cols., 2001); doença de Crohn (Erjefalt e cols., 2001); dermatite atópica (Cheng e cols., 1997); carcinoma gástrico (Caruso e cols., 2005); shingelose (Raqib e cols., 2003) e cólera (Qadri e cols., 2004). O número de grânulos esvaziando em eosinófilos humanos aumenta quando as células estão ativadas, tanto *in vivo* como *in vitro* em diferentes condições (Erjefalt e cols., 1998, Karawajczyk e cols., 2000, Ahlstrom-Emanuelsson e cols., 2004, Melo e cols., 2005a).

Estímulos inflamatórios, tais como os agonistas clássicos de eosinófilos, a CCL5/RANTES e a CCL11/eotaxina ou fator ativador de plaquetas (PAF), levam à desgranulação por *piecemeal*. E o pré-tratamento com brefeldina A, um inibidor do transporte vesicular (Nebenfuhr e cols., 2002), impede o esvaziamento dos grânulos quando estimulados (Melo e cols., 2005a). Estudo utilizando agonistas de eosinófilos mostrou que, enquanto apenas 8% dos grânulos de eosinófilos não estimulados tinham grânulos apresentando sinais de desgranulação por *piecemeal*, esse percentual aumentou para 25% em células estimuladas com RANTES, 43% nas estimuladas com CCL11, e 34% nas estimuladas com PAF (Melo, R. C. N.; Spencer, L. A.; Perez, S. A. C.; Ghiran, I. *et al.*, 2005).

Usando a técnica de imunomarcção ultraestrutural chamada de *pre-embedding* que é realizada antes do processamento para microscopia eletrônica, nosso grupo identificou um trânsito vesicular de proteínas armazenadas nos grânulos (Melo e cols., 2005b, Melo E Cols., 2009). Essa metodologia possibilitou marcar proteínas tipicamente estocadas nos grânulos como IL-4 e MBP e assim identificar sua rota de secreção (MELO E COLS., 2005B, MELO E COLS., 2008A, SPENCER E COLS., 2009).

Estudos do nosso grupo identificaram que o transporte de MBP (Melo e cols., 2009) e citocinas, como IL-4 (BANDEIRA-MELO E COLS., 2001), é realizado através de EoSVs. O estímulo com CCL11 ou CCL5 em eosinófilos humanos, libera rapidamente IL-4 através do transporte vesicular (BANDEIRA-MELO E COLS., 2001). Foi demonstrado que a IL-4 é transportada pelas EoSVs graças a receptores de IL-4R α em sua membrana (SPENCER E COLS., 2006). Também foi demonstrado que eosinófilos possuem uma quantidade substancial de outros receptores de citocinas associados à grânulos e vesículas, como os receptores IL-6R α e IL-13R α 1. Estoques de CCR3 intracelular também são expressos em eosinófilos humanos, e sua detecção está aumentada após estímulo que induz a liberação de CCL5 (SPENCER; MELO; PEREZ; BAFFORD *et al.*, 2006)

Citólise

O processo de citólise ocorre através da lise da célula e deposição dos grânulos secretores de eosinófilos, intactos no meio extracelular. Ultraestruturalmente este processo é caracterizado por alterações nucleares como descondesação e dissolução da cromatina e do envoltório nuclear, assim como ruptura da membrana plasmática acompanhada de deposição dos grânulos, podendo estar livres ou aglomerados (cfegs) nos tecidos (Figura 4) (PERSSON E ERJEFALT, 1997B, ERJEFALT E COLS., 1998). Os cfegs depositados nos tecidos aparecem como um conjunto heterogêneo de grânulos, envoltos por membrana (PERSSON E ERJEFALT, 1997B) (Figura 4).

Esses achados são observados *in vivo* em estudos com vias aéreas humanas alérgicas (ERJEFALT E COLS., 1998), pólipos nasais (ULLER E COLS., 2004) e após desafio com alérgeno ou em resposta à denudação mecânica epitelial (REVISTO EM PERSSON E ERJEFALT, 1997A). Eosinófilos em citólise também podem ser observados *in vitro* após a exposição ao ionóforo de cálcio bivalente A23187 ou esferas opsonizadas com IgA secretado (REVISTO EM PERSSON E ERJEFALT, 1997A, MELO E COLS., 2013A).

Eosinófilos são capazes de sofrer morte citolítica, acompanhada da liberação de DNA nuclear e extrusão de grânulos funcionais intactos, processo chamado de ETosis (UEKI E COLS., 2013). Os autores demonstraram que a estimulação com IgG ou IgA23 imobilizados, ionóforo de cálcio, PAF ou forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) podem desencadear ETosis em eosinófilos humanos, de uma maneira dependente de NADPH-oxidase (Ueki e cols., 2013).

Os grânulos de eosinófilos humanos (NEVES E COLS., 2008, NEVES E COLS., 2010, SHAMRI E COLS., 2012) e murinos (SHAMRI E COLS., 2012), isolados a partir

de fracionamento subcelular, expressam o receptor CCR3 funcional e secretam ECP em resposta a CCL11. Outro receptor expresso por esses grânulos é o IFN- γ R. Esses fatos promovem evidências diretas que os receptores da membrana dos grânulos são funcionais e capazes de iniciarem processos de sinalização. Foi observado também que grânulos isolados estimulados com IFN- γ secretam ECP, EPO, IL-4 e IL-6 (NEVES E COLS., 2008).

O processo de desgranulação por citólise é frequentemente observado em doenças humanas. Grânulos podem ser visualizados extracelularmente em biópsias de tecidos de pacientes com dermatite atópica (CHENG E COLS., 1997), alergia nasal (ERJEFALT E COLS., 1999, WATANABE E COLS., 2003), pólipos nasais (ERJEFALT E COLS., 1998) e outras desordens de mucosa das vias respiratórias (ERJEFALT E PERSSON, 2000), como também em amostras de escarro de asmáticos (PERSSON E COLS., 2002), em associação com tecido em pacientes com i) rinosinusite crônica (GREIFF E COLS., 1998, PONIKAU E COLS., 2005), ii) lesões de necrose de gordura subcutânea em recém-nascidos (TAJIRIAN E COLS., 2007), iii) urticária (REVISTO EM MELO E COLS., 2013A), iv) esofagite eosinofílica (ACEVES E COLS., 2007), v) pacientes com *Onchocerca volvulus* tratados com amocazine (GUTIERREZ-PENA E COLS., 1998) e vi) pacientes com carcinoma gástrico avançado (CARUSO E COLS., 2005).

Análises de ME identificaram a presença de grânulos envoltos por membrana fora da célula, na matriz extracelular de biópsias de paciente com dermatite atópica (CHENG E COLS., 1997). No tratamento com amocazine foram observados grânulos livres na superfície da microfilaria danificada de *Onchocerca volvulus* (GUTIERREZ-PENA E COLS., 1998). Imagens de MET revelaram a deposição extracelular de grupos de grânulos juntamente a corpúsculos lipídicos adjacentes a eosinófilos em apoptose tardia, em pacientes apresentando carcinoma gástrico avançado (CARUSO E COLS., 2005).

Os grânulos liberados extracelularmente por citólise são funcionalmente ativos e capazes de atuarem como “Cluster Bombs” que amplificam as propriedades secretoras funcionais de eosinófilos e contribuem para a exacerbação e persistência da resposta inflamatória (NEVES E COLS., 2008, MUNIZ E COLS., 2013).



Figura 4- Mecanismos de secreção de eosinófilos. Os eosinófilos podem secretar suas proteínas granulares por exocitose (fusão grânulo-grânulo antes da liberação extracelular); desgranulação por *piecemeal* (transporte vesicular de pequenos pacotes de materiais dos grânulos secretores para a superfície celular); e/ou citólise (deposição extracelular de grânulos após lise celular). Mais de um processo pode estar envolvido em respostas inflamatórias. Figura reproduzida de SPENCER et al., 2014.

1.4. Fator de célula tronco (SCF) em processos de diferenciação e ativação de eosinófilos

Fator de Célula Tronco (SCF – *Stem cell factor*), também conhecido como ligante do c-kit, é uma citocina conhecida por estar envolvida na diferenciação e maturação de células hematopoiéticas (MCNIECE E BRIDDELL, 1995; BROUDY, 1997), tais como mastócitos, basófilos (DVORAK *ET AL.*, 1994) e eosinófilos (METCALF *ET AL.*, 2002). Além disso, o SCF vem sendo descrito como possuidor de um importante papel em respostas inflamatórias, tendo uma alta expressão em doenças como a asma, rinite alérgica e artrite reumatóide, revisado em (REBER *ET AL.*, 2006). A presença de SCF em condições de alergia está correlacionada com o recrutamento de eosinófilos (LUKACS *ET AL.*, 1996; FINOTTO *ET AL.*, 2001), mesmo que não seja diretamente responsável pela sua quimiotaxia, o que é provavelmente causada como uma consequência da ativação de mastócitos induzida por SCF (LUKACS *ET AL.*, 1996).

Sabe-se que eosinófilos possuem tanto o receptor c-kit na membrana plasmática (YUAN *ET AL.*, 1997), quanto o seu ligante, o SCF, que se encontra armazenado no interior de seus grânulos secretores (HARTMAN *ET AL.*, 2001). Essa citocina é capaz de induzir a secreção de diversos mediadores imunes em eosinófilos (OLIVEIRA *ET AL.*, 2002), além de promover a sua sobrevivência (DOLGACHEV *ET AL.*, 2007) e adesão celular (YUAN *ET AL.*, 1997).

O SCF foi usado em décadas passadas para testes clínicos em pacientes com câncer a fim de induzir a mobilização de células progenitoras do sangue periférico, por injeções subcutâneas de Fator de Célula Tronco Recombinante Humano (rhSCF – *Recobinant Human Stem Cell Factor*), como uma tentativa de encontrar uma alternativa para o recrutamento destas células em indivíduos que passaríamos por quimioterapia mieloblástica (Glaspy *et al.*, 1996; Moskowitz *et al.*, 1997). Estudos anteriores mostraram, usando a MET, que estas injeções subcutâneas de rhSCF induzem uma resposta alérgica, caracterizada como uma dermatite, com recrutamento de leucócitos, incluindo o eosinófilo, e com a ativação de mastócitos (Costa *et al.*, 1996; Dvorak *et al.*, 1998).

Em doenças como asma, rinite alérgica e artrite reumatóide, o SCF desempenha um papel importante, sendo competente para recrutar e ativar células imunes (REBER, DA SILVA ET AL. 2006). Os efeitos do SCF sobre os eosinófilos tem sido extensivamente estudados *in vitro*, em estudos *in vivo* demonstram que as injeções subcutâneas de SCF podem promover uma dermatite local caracterizada por infiltração de eosinófilos e mastócitos acompanhada de hiperplasia de melanócitos (DVORAK, COSTA ET AL. 1998).

1.5. Aspectos mitocondriais

Os estudos sobre dinâmica mitocondrial tiveram mais espaço graças ao advento da microscopia eletrônica de transmissão na década de 1930. Os primeiros estudos iniciados em 1950 mostraram aspectos ultraestruturais das mitocôndrias que identificaram a presença de duas membranas (externas e internas), tendo a membrana interna como formadora de estruturas achatadas chamadas de cristas (DETMER, 2007). As cristas mitocondriais são preenchidas com uma matriz onde abriga as cadeias de DNA, ribossomo, pequenos grânulos e moléculas importantes no processo respiratório aeróbico (MILLS ET AL. 2017).

São organelas dinâmicas envolvidas em funções essenciais para as células, como produção de energia (por exemplo: ATP), controle da nutrição e da taxa de oxigênio, síntese de macromoléculas, morte e sinalização celular. Assim, têm um papel crítico em diversos processos metabólicos e homeostáticos, bem como resposta celular contra condições de estresse ou processo inflamatório (CLOONAN E CHOI, 2016).

Sabe-se que o tamanho, a forma e a distribuição dessas organelas estão

estritamente relacionadas ao processo de fusão e fissão. Uma variedade de característica sobre a morfologia mitocondrial é encontrada mediante a estímulos fisiológicos, podemos identificar desde pequenas esferas até formas tubulares alongadas. As células que apresentam menor taxa de fusão estão relacionadas ao formato mitocondrial circular, sendo numerosas no interior das células, assim são denominadas de “mitocôndrias fragmentadas” (DETMER, 2007). Além disso, foi observado que a membrana da ultraestrutura está diretamente relacionada ao estado metabólico dessas organelas, pois o processo de fusão permite alterar o conteúdo entre mitocôndrias e minimiza os problemas de mitocôndrias defeituosas (PICARD ET AL, 2013).

Durante o processo de morte celular, ocorre um intenso processo de fissão diretamente associado à velocidade e eficiência da morte celular e às alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial. A estreita associação entre apoptose e vias reguladoras da forma mitocondrial é evidenciada pelos dois processos já bem estabelecido como agentes de alteração da permeabilidade que desencadeia o processo de morte. Durante este processo podemos observar mudanças na morfologia mitocondrial na tentativa de regular os efeitos na membrana (DETMER, 2007).

Por outro lado, a fusão mitocondrial não é essencial para a sobrevivência da célula, mas é completamente necessária para os estágios de desenvolvimento celular, uma vez que a fusão pode minimizar os danos em lipídios e alterações em proteínas. Esse processo ainda é necessário para otimizar a fosforilação oxidativa, pois a diminuição das taxas metabólicas leva à ruptura das cristas mitocôndrias (BOLAND ET AL, 2013; YOULE ET AL 2012)

Outro aspecto muito importante está relacionado à distribuição mitocondrial no interior da célula, alguns estudos mostram que as mitocôndrias tendem a se localizar mais próximas dos núcleos em condições hipóxia do que em normóxia (BOLAND ET AL., 2013). Trabalhos recentes destacaram a importância de que a associação entre mitocôndrias e outras organelas celulares, como o retículo endoplasmático, esteja estritamente associada aos locais do processo de fusão. (FRIEDMAN ET AL 2011). As proteínas mitocondriais desempenham um elo entre as mitocôndrias e o retículo para permitir a captação de cálcio do retículo para as mitocôndrias. (DE BRITO, ET AL 2008).

Nos eosinófilos, pouco se sabe sobre a dinâmica mitocondrial, no entanto, já é sabido que, nos linfócitos, esse processo parece ser importante para a redistribuição mitocondrial durante a quimiotaxia, onde são concentradas nas bordas das células (DETMER, 2007). Em eosinófilos humanos, sabe-se que os altos níveis de proteínas

pró-apoptóticas são capazes de controlar as respostas de sobrevivência ou apoptose através da regulação negativa dessas proteínas e liberação de ROS. Altos níveis de liberação de ROS causam lesão mitocondrial e conseqüentemente, amplificar os sinais de morte celular (Ilmarinen et al, 2014).

As células imunológicas em geral têm necessidade de rápida adaptação metabólica, no caso dos eosinófilos, eles exibem uma respiração respiratória basal, porém significativamente mais eficiente em comparação aos neutrófilos. Além disso, os eosinófilos utilizam a via de oxidação da glicose diferente dos neutrófilos, tornam-se muito mais flexíveis, obtendo melhores respostas na defesa do hospedeiro, homeostase e processo inflamatório e imunomodulação (PORTER ET AL, 2018). Alguns estudos apontam para a importância das mitocôndrias no desenvolvimento hematopoiético, com alterações no conteúdo mitocondrial e no potencial de membrana ou na produção de ATP. O alto perfil metabólico mitocondrial é essencial para o desenvolvimento celular durante o processo de hematopoese (BONORA ET AL, 2015).

1.6. Justificativas

A habilidade de eosinófilos em responder a estímulos durante diferentes situações fisiológicas e doenças se baseia na sua capacidade de secreção e, portanto, os grânulos de secreção de eosinófilos, nos quais mediadores imunes e outros compostos são armazenados, tornam-se organelas-chave para o entendimento das funções dessas células (MELO; DVORAK; WELLER, 2010; WELLER; SPENCER, 2017)

Culturas de eosinófilos murinos são amplamente utilizadas como estratégia experimental para estudo de diferentes aspectos funcionais destas células (O'SULLIVAN; BOCHNER, 2018). No entanto, muito pouco se conhece sobre o processo de granulogênese de eosinófilos murinos. Quais são as características morfológicas dos grânulos secretores de eosinófilos murinos em processo de diferenciação? Como caracterizar um eosinófilo murino maduro em cultura? Eosinófilos murinos em processo de maturação são aptos a secretarem? Para responder essas perguntas, pretende-se no presente trabalho aplicar técnicas de MET para caracterização ultraestrutural da população de grânulos secretores em diferentes fases de culturas de eosinófilos a partir das células derivadas da medula óssea. A MET é a única técnica com resolução suficiente para distinguir grânulos com a presença ou não de cristalóide, o qual caracteriza grânulos maduros, além de alterações indicativas de processos secretores (MELO; DVORAK; WELLER, 2010).

Outro aspecto a ser investigado refere-se à atuação de SCF em culturas de eosinófilos murinos. Conforme ressaltado, esta citocina tem papel crucial na maturação de precursores de eosinófilos e também é capaz de ativar células maduras (DORN; LAZAR-KARSTEN; BOIE; RIBBAT *et al.*, 2008; DYER; PERCOPO; ROSENBERG, 2013; FONSECA; RASKY; PTASCHINSKI; MORRIS *et al.*, 2019). Entretanto, vários aspectos ainda não foram investigados. Por exemplo, SCF atua diretamente em células comprometidas com a linhagem eosinofílica, sendo capaz de aumentar a formação de grânulos maduros (contendo cristalóide). Ultraestruturalmente, os processos de secreção de eosinófilos tanto imaturos como maduros, tanto em modelos experimentais como humanos, sob efeito de SCF, jamais foram estudados. Nesse sentido, pretende-se investigar, por MET, a população de grânulos secretores e os níveis de citocinas librados (IL-4, IL-6 e IL-13) quando eosinófilos murinos são diretamente ativados por SCF. Adicionalmente, e, considerando que SCF leva eosinófilos humanos a secretarem (OLIVEIRA; TAUB; NAGEL; SMITH *et al.*, 2002), perguntamos quais são os mecanismos estruturais envolvidos. No presente trabalho, eosinófilos humanos isolados do sangue e estimulados com SCF e eosinófilos teciduais, sob efeito de SCF *in situ*, serão investigados por MET para identificação de seus processos de secreção.

Como último aspecto a ser abordado nesta tese, focamos no perfil mitocondrial de eosinófilos. Existe um interesse crescente no entendimento da atividade de mitocôndrias, consideradas organelas multifuncionais, na quais alterações morfológicas estão intimamente relacionadas com sua fisiologia (CANTO, 2018; SEO; YOON; DO, 2018). Em células do sistema imune, conforme ressaltado, documenta-se uma relação das mitocôndrias com respostas imunes (BANOTH; CASSEL, 2018). No entanto, nosso conhecimento sobre a distribuição, organização e ultraestrutura de mitocôndrias em células do sistema imune e, particularmente em eosinófilos murinos, é pobre. Por isso, objetivamos estudar esses aspectos tanto em eosinófilos ao longo de seu processo de diferenciação como também em eosinófilos ativados com estímulos inflamatórios. Para responder como é o perfil mitocondrial em eosinófilos nessas condições (em células imaturas, maduras e ativadas), pretendemos aplicar técnicas convencionais e avançadas de MET que permitem visualização da estrutura mitocondrial em três dimensões (tomografia eletrônica).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar as características morfológicas da população dos grânulos secretores e o perfil mitocondrial de eosinófilos ao longo da diferenciação e ativação celular.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1** Caracterizar por MET a formação de grânulos específicos durante a diferenciação de eosinófilos murinos em culturas, a partir de células da medula óssea.
- 2.2.2** Avaliar a ultraestrutura de grânulos secretores de eosinófilos murinos em diferenciação em resposta ao tratamento com SCF.
- 2.2.3** Investigar a habilidade de secreção de IL-4, IL-6 e IL-13 de eosinófilos murinos em resposta ao estímulo com SCF.
- 2.2.4** Investigar os mecanismos de secreção de eosinófilos humanos sob efeito de SCF.
- 2.2.5** Caracterizar o perfil mitocondrial de eosinófilos murinos durante a diferenciação e a ativação celular com CCL11, SCF e TNF- α .

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2 Animais, eutanásia e coleta de amostras

Camundongos Balb/C machos (n= 10) de 8-10 semanas de idade e com peso corporal de 20 – 28 g foram utilizados para todos os experimentos. Os animais fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz – RJ foram mantidos em temperatura ideal (23-25°C) e ciclo circadiano controlado (12/12 h), com acesso irrestrito à água e ração.

Para estabelecimento das culturas de eosinófilos, os animais (n=10) foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Fêmures e tíbias foram retirados e a coleta de células da medula óssea foi realizada conforme descrito a seguir (Seção 3.2). Para eutanásia foi administrado cloridrato de ketamina (100 mg/mL) associado à acepromazina (10 mg/mL) na proporção de 9:1, numa dose de 0,15 mL/100 g de peso.

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com as normas de biossegurança e seguindo protocolos aprovados pelo comitê de ética para o uso de animais de experimentação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (número IBCCF065)

2.3 Cultura de eosinófilos derivados da medula óssea (BMEos) de murinos

2.3.1 Cultura convencional de BMEos

Eosinófilos foram diferenciados *in vitro* de células coletadas da medula óssea (BMEos) conforme (DYER, KIMBERLY D.; MOSER, JENNIFER M.; CZAPIGA, MEGGAN; SIEGEL, STEVEN J. *et al.*, 2008a). Células da medula óssea foram coletadas dos fêmures e tíbias de camundongos BALB/c. As epífises dos ossos foram retiradas e a medula coletada utilizando uma seringa com agulha 26G. As epífises dos ossos foram retiradas e foi feito um lavado das medulas com RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY) sem soro. Para lise das hemácias, as células foram centrifugadas a 100 g por 5 min e ressuspensas em NaCl a 0,2%, seguido da adição de NaCl a 1,6%. Após lise de hemácias, as células medulares foram

cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma) com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab) e suplementado com Piruvato de sódio 1% (Sigma), aminoácidos não essenciais 1% (Sigma) e glutamina 1% (Sigma). A concentração das células progenitoras foi ajustada para 1×10^6 células/mL.

Do dia 0 ao dia 4 da cultura o meio foi suplementado com 100 ng/mL de fator de célula tronco (SCF, do inglês stem cell factor; rmSCF; Peprotech) e 100 ng/mL de ligante de FLT3 (rmFLT3-L; Peprotech). A partir do dia 4 o meio contendo SCF e FLT3 foi completamente substituído por meio fresco contendo 10 ng/mL de IL-5 murina recombinante (rmIL-5; Peprotech, Figura 5). No dia 8 de cultura as células do sobrenadante foram centrifugadas e movidas para garrafas novas e mantidas em meio fresco suplementado com rmIL-5. Desse ponto em diante metade do meio foi substituído por meio fresco contendo rmIL-5 a cada dois dias e a concentração das células reajustada para 1×10^6 células/mL. Todos os procedimentos foram repetidos em triplicata.

2.3.2 Cultura de BMEOs com suplementação contínua de SCF

Culturas de eosinófilos derivados da medula óssea foram inicialmente estabelecidas conforme a cultura convencional. Entretanto, alternativamente foi incluído rmSCF na mesma concentração do dia 0 (100 ng/mL) nos dias que acompanhavam a adição de rmIL-5, até o dia 14 da cultura (Figura 5). Os procedimentos foram repetidos em triplicata.

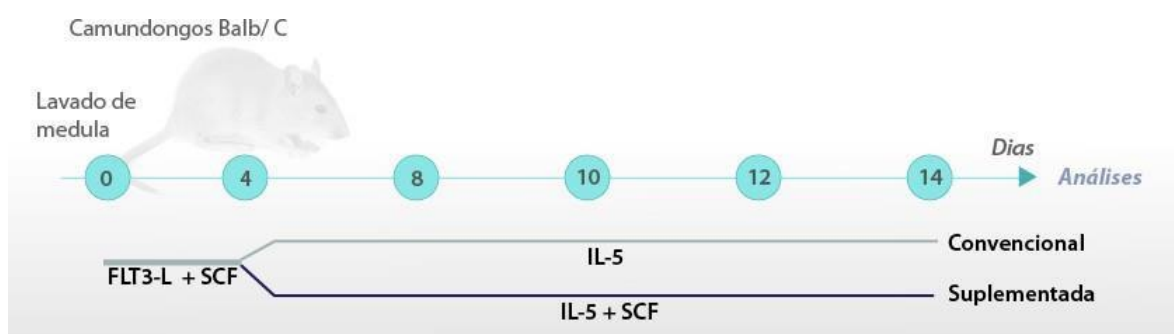


Figura 5 - Desenho experimental das culturas de eosinófilos derivados da medula óssea. A cultura foi estabelecida da forma convencional com adição de SCF (+FLT3-L) até o 4º dia e após isso apenas adicionado IL-5. Alternativamente, culturas após o 4º dia foram estabelecidas com suplementação contínua de SCF acompanhada da adição de IL-5.

2.3.3 Acompanhamento da diferenciação das BMEos ao longo das culturas

A contagem e a avaliação da diferenciação das células ao longo do estabelecimento das culturas convencionais e das culturas com suplemento contínuo com SCF foi realizado por microscopia de luz e citometria de fluxo, nos dias 0, 4, 8, 10, 12 e 14. Para análises por microscopia, aliquotas das culturas foram citocentrifugadas (100 g, aceleração média por 5 minutos), coradas com panótico e analisadas em microscópio de luz de campo claro (Olympus, BX51).

Para análises ao citometro de fluxo, as células derivadas da medula óssea em cultura (dia 14) foram marcadas para expressão de Siglec-F, proteína normalmente presente em eosinófilos murinos diferenciados (DYER, KIMBERLY D.; MOSER, JENNIFER M.; CZAPIGA, MEGGAN; SIEGEL, STEVEN J. *et al.*, 2008a). As células (1×10^6 céls / poço) foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% e permeabilizadas por 5 min em gelo com saponina a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Logo após, foi feita a incubação com o anti-Siglec-F murino ou seu isotipo IgG2a (1: 100, BD Pharmingen, CA, EUA) por 30 min. Em seguida, essas células foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário (fitoeritrina) conjugado com FITC por 15 min em gelo na presença contínua de saponina. Todos os dados foram adquiridos em um citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences) e analisados com o software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR).

2.3.4 Estimulação de eosinófilos murinos diferenciados nas culturas

Eosinófilos diferenciados da medula óssea (10^6 células/mL), coletados no dia 14 da cultura, foram estimulados com CCL11 recombinante de camundongo (100ng/mL; Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA) ou TNF- α (100ng/mL; Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA) ou SCF (100ng/mL; Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA), conforme descrito por (Shamri, Melo *et al.* 2012). Células pré-tratadas com concentrações equivalentes de veículo com meio RPMI-1640 foram utilizadas como controles. Todos os tratamentos foram incubados à 37°C, por 1 hr (BioWhittaker, Walkersville, MD, EUA). A viabilidade celular após inibição e estimulação foi > 93%, conforme detectada por microscopia de luz após coloração das células com azul de tripan.

24 Isolamento de eosinófilos humanos do sangue periférico

Eosinófilos humanos foram isolados de doadores saudáveis e purificados por seleção negativa segundo (MELO, ROSSANA CN; PEREZ, SANDRA AC; SPENCER, LISA A; DVORAK, ANN M *et al.*, 2005). Sangue de 5 indivíduos saudáveis foi coletado, usando seringas contendo citrato de sódio 130 mM (pH 5,2). Após sedimentação (30 min, à temperatura ambiente) e remoção de células mononucleares (Ficoll-Paque TM, Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), os eosinófilos foram purificados por seleção negativa usando um coquetel de enriquecimento de eosinófilos humanos (StemSepTM, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) e por procedimento de seleção celular com anticorpos ligados a partículas magnetizadas (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EUA). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Investigações Clínicas do Beth Israel Deaconess Medical Center (BIDMC) e o consentimento foi obtido de todos os indivíduos. A pureza (99%) e viabilidade (95%) dos eosinófilos foi verificada por análise microscopia de luz após coloração com o kit HEMA 3 R ou brometo de etídio.

25 Estimulação de eosinófilos humanos isolados

Os eosinófilos purificados (1×10^6 células/amostra) foram estimulados com rhSCF (1, 10, 100 e 200ng / mL; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) em meio RPMI-1640 e ovalbumina a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Controles foram mantidos apenas no meio a 37° C por 1h.

26 Quantificação da liberação de Proteína Catiônica do Eosinófilo

Os níveis de Proteína Catiônica do Eosinófilo (ECP) nos sobrenadantes de eosinófilos estimulados ou não com rhSCF foram analisados usando o kit de ELISA para ECP humana (Medical & Biological Labs, Naka-ku Nagoya, Japão) de acordo com as instruções do fabricante.

27 Biópsias de pele humana de locais com injeção subcutânea de rhSCF

Biópsias de pele foram obtidas conforme descrito por (DVORAK, ANN M; COSTA, JOHN J; MONAHAN-EARLEY, RITA A; FOX, PATRICIA *et al.*, 1998).

Resumidamente, três pacientes receberam injeções subcutâneas diárias de rhSCF (25 mg/kg por dia) na coxa anterior por um período de 13 dias. Após a injeção intradérmica local de uma solução a 1,0% de lidocaína (0,5 ml), a aproximadamente 1-2 cm do local planejado da biópsia. Foram obtidas biópsias por punção (4 a 6 mm) da pele no local das lesões que se desenvolveram dentro de aproximadamente 60 minutos após a injeção de rhSCF. As biópsias foram obtidas entre 1 hora e 40 minutos ou 2 horas e 30 minutos após a injeção do rhSCF no local. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Estudos Humanos do Beth Israel Deaconess Medical Center (BIDMC).

28 Microscopia Confocal

A análise da população mitocondrial foi realizada através da sonda MitoTracker Red CMXRos (Life Technologies). De maneira geral, células obtidas em diferentes dias de cultura foram coletadas e centrifugadas em 100 g a temperatura ambiente. Em seguida, os pellets foram ressuspensos em MitoTracker Red na concentração de 10 nM por 5 min. Após consecutivas lavagem para evitar o background da fluorescência, as amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% e montadas em meio de selagem VectaShield com DAPI (VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI, VectorLab). As imagens foram obtidas através do microscópio Nikon Eclipse Ti equipado com uma cabeça C2 confocal e analisados no software Volocity 6.3 (PerkinElmer). As imagens capturadas das células foram analisadas utilizando o programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

29 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Todas as amostras coletadas foram imediatamente fixadas em solução de Karnovsky modificado conforme Tabela 1. Amostras de células suspensão após fixação foram incluídas em ágar 2%, o que possibilita que as etapas subsequentes sejam realizadas sem o contato direto com os organismos. Esta pré-inclusão em ágar reduz os artefatos causados por danos mecânicos e a perda de espécimes durante os procedimentos que se seguem (MELO, ROSSANA CN; PEREZ, SANDRA AC; SPENCER, LISA A; DVORAK, ANN M *et al.*, 2005).

Amostra	n	Tipo de amostra	Fixador	Tempo de fixação	Temperatura de fixação
Cultura BMEos murino convencional	5	Suspensão celular	Paraformaldeído 1 % e glutaraldeído 1,25 % em tampão fosfato 0.1 M, pH 7,4	1 h	Temp. ambiente
Cultura BMEos murino com suplementação continua de SCF	5				
Eosinófilos humanos isolados do sangue estimulados ou não com SCF, CCL11 ou TNF α	17				
Biópsias de pele humana	5	Fragmentos teciduais	Paraformaldeído 2 % e glutaraldeído 2,25 % em tampão fosfato 0.1 M, pH 7,4	overnight	4 °C

Tabela 1: Tipo e número de Amostras processadas para MET com detalhes do procedimento de fixação.

Os blocos de ágar contendo as suspensões celulares e os fragmentos de tecido foram pós fixados em ósmio reduzido (ferrocianeto de potássio 3% em tampão fosfato 0.1M e ósmio 2% em água destilada) por 1h em temperatura ambiente e lavados por 3 vezes em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3. Em seguida, as amostras foram desidratadas em álcool (50%, 70%, 90%, 95%), passando em cada etapa duas vezes por 5 minutos e, posteriormente em acetona. Após a desidratação, as amostras foram pré-infiltradas em meio de inclusão epon/acetona (2:1) overnight à temperatura ambiente, infiltradas em meio com DPM-30 e incluídas em resina (Polybed 812, Polysciences, Warrington, PA, USA). Após polimerização por 16 horas à 60°C, foram feitos cortes ultrafinos em ultramicrotomo (Sorval MT2, newton, MA, USA), os quais foram contrastados com citrato de chumbo. As amostras foram analisadas em diferentes aumentos em microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2-12) em 60 KV.

2.10 Tomografia eletrônica e reconstrução 3D

Amostras previamente incluídas em Epon (conforme descrito na Seção 3.10) foram seccionadas à 200 nm. As secções foram mantidas em telas de cobre de 100 *mesh* cobertas com *formvar*. Os *tilts* foram adquiridos de forma automática em um microscópio Tecnai Spirit G12 120kv (Thermo Fisher Scientific/FEI, Eindhoven, Holanda), utilizando o software Serial EM/Tomography (FEI). Imagens digitais das estruturas de interesse foram registradas nos ângulos de -65° para +65° em intervalos de 1°. Todas as imagens foram alinhadas ao eixo de inclinação comum usando correlação cruzada, e o volume foi reconstruído por retroprojeção ponderada no espaço real. Os tomogramas foram gerados usando o software SerialEM (MASTRONARDE, 2005) e o modelamento foi realizado no software IMOD (MASTRONARDE; HELD, 2017).

2.11 Análises Ultraestruturais

2.11.1 Características ultraestruturais de grânulos específicos durante a diferenciação de eosinófilos murinos em culturas

Características ultraestruturais de grânulos específicos durante a diferenciação dos eosinófilos foram estudadas por MET convencional. Ao microscópio eletrônico de transmissão convencional, micrografias foram obtidas aleatoriamente de secções celulares mostrando todo o perfil dos eosinófilos e o núcleo. Um total de 98 eletromicrografias e 697 grânulos foram analisados em aumentos de 11000-23000. A morfologia dos grânulos foi estudada em todas as células das culturas convencional (estimuladas ou não com SCF) e suplementada com SCF.

Inicialmente, todos os grânulos foram avaliados independentemente do estágio de maturação da célula. Assim, as diferentes populações de grânulos - que representam diferentes estágios de maturação do grânulo - foram caracterizadas com base em aspectos gerais dos grânulos, como elétrondensidade da matriz, presença de cristalóide e conteúdos membranosos. Em seguida, análises morfométricas de área, perímetro, diâmetro e circularidade das populações de grânulos foram obtidos. E finalmente, as populações de

grânulos caracterizadas foram relacionadas com o estágio de diferenciação dos BMEos. Como não existe uniformidade na classificação das células comprometidas com a linhagem eosinofílica, foram considerados 2 perfis ultraestruturais básicos de eosinófilos em relação ao processo de diferenciação: maduro e imaturo. Eosinófilos maduros foram considerados com base nas características ultraestruturais de eosinófilos residentes do pulmão, que apresentaram (i) núcleo lobulado e (ii) presença de grânulos com cristalóide em diferentes proporções. Eosinófilos com ausência de alguma destas duas características foram considerados imaturos. Os grânulos foram contados diferencialmente e a proporção das populações de grânulos por secção celular obtido.

2.11.2 Avaliação ultraestrutural de processos secretores de eosinófilos humanos sob efeito de SCF *in vitro* e *in vivo*.

Para estudos realizados por MET convencional de eosinófilos *in vitro* (eosinófilos isolados do sangue e estimulados com SCF) obtivemos aleatoriamente micrografias eletrônicas de seções celulares, mostrando todo o perfil celular ou de conteúdos derivados do eosinófilo (i.e. grânulos livres). Para análise por MET das biópsias da pele, foi estudada uma área de 6240 μm^2 de tecido do sítio inflamatório contendo eosinófilos e/ou conteúdos celulares de eosinófilos. Foram analisadas 34 eletromicrografias (*in vitro*: 34 micrografias [células não estimuladas: 17, células estimuladas por SCF: 17]; *in vivo*: xx micrografias).

Os grânulos secretores foram classificados e contados em duas categorias: i) Grânulos intactos mostrando núcleo cristalóide elétron-denso e íntegro, com a matriz elétron-lúcida; e ii) Grânulos em processo de esvaziamento: caracterizados por alteração da forma e elétron-densidade, desestruturação do cristalóide e/ou matriz, presença de vesículas membranosas intragranulares e/ou perigranulares, matriz com aspecto rugoso e/ou alterações da membrana limitante (Shamri et al., 2012). No total, foram contados 836 grânulos secretores (439 de eosinófilos estimulados por SCF e 397 de não estimulados) e 985 EoSVs (639 de eosinófilos estimulados por SCF e 346 de não estimulados). Em tecido, foram contados 467 grânulos secretores e 538 EoSVs. Todos os estudos morfométricos e quantitativos foram realizados usando o software ImageJ (National Institutes of Health,

Bethesda, MD).

2.11.3 Aspectos ultraestruturais das mitocôndrias de eosinófilos murinos durante o desenvolvimento e ativação celular

Para estudo da ultraestrutura de mitocôndrias por MET, eosinófilos em cultura foram avaliados em diferentes condições. Um total de 87 eletromicrografias de eosinófilos foram estudadas para avaliação qualitativa e quantitativa, a saber: células não estimuladas: 27; células estimuladas com CCL11, TNF α ou SCF (n= 20, para cada estímulo). As eletromicrografias foram aleatoriamente obtidas em aumentos de 11.000-23.000X. Um total de 892 mitocôndrias, a partir dessas células foi então investigado [n=402 (células não estimuladas); n= 207 (SCF); n= 105 (CCL11); n= 178 (TNF α)]. A avaliação do perfil mitocondrial foi feita em secções celulares que mostravam todo perfil celular e núcleo.

Aspectos mitocondriais como tamanho, forma, cristas e elétron-densidade da matriz foram avaliados qualitativa e quantitativamente usando o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Para análises morfométricas, as mitocôndrias foram medidas e a área, diâmetro, perímetro, circularidade (eixo horizontal dividido pelo eixo transversal) foram obtidos. As mitocôndrias foram contadas e o número e área proporcional de mitocôndrias por área de citoplasma foi estabelecida para cada secção celular.

2.12 Análises estatísticas

Todos os dados foram tratados e os resultados foram expressos como média \pm EPM e analisados segundo o teste de ANOVA ou teste T com nível de significância $p < 0.05$, usando o programa GraphPad Prism 7.0 (Graphpad Software, San Diego, CA).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização dos eosinófilos derivados da medula óssea

Para confirmar a presença de eosinófilos na cultura de células derivadas da medula óssea (Figura 6A), foi utilizada a citometria de fluxo para detectar marcador específico da membrana de eosinófilos murinos (Siglec F), conforme descrito por Dyer, 2008 (DYER, KIMBERLY D.; MOSER, JENNIFER M.; CZAPIGA, MEGGAN; SIEGEL, STEVEN J. *et al.*, 2008b). Esta avaliação foi realizada durante diferentes dias da cultura (0, 4, 8, 10, 12, 14) (Figura 6B). No 14^o dia da cultura, o percentual de células identificadas como células SiglecF⁺ e, portanto, como eosinófilos, foi de 82% (Figura 6B). Amostras de eosinófilos obtidas no 14^o dia, foram então fixadas e processadas para MET para observação das características ultraestruturais destas células, especialmente dos grânulos secretores. Nós queríamos saber se esta população de eosinófilos exibia grânulos específicos maduros no 14^o dia da cultura, ponto final de cultura, caracterizados pela presença de cristalóide (MELO; WELLER, 2018). Apenas 12% dos eosinófilos mostraram grânulos completamente maduros em quantidades variáveis no citoplasma.

Em paralelo, amostras de populações celulares, coletadas nos diferentes pontos da cultura, foram preparadas para análises ultraestruturais qualitativas e quantitativas. Estas análises revelaram a presença de eosinófilos com diferentes morfologias em todos os pontos da cultura (Figura 7A-D). Basicamente, observamos duas populações principais de eosinófilos: eosinófilos imaturos, chamados mielócitos eosinofílicos, caracterizados pela presença apenas de grânulos específicos imaturos (sem cristalóide) e eosinófilos maduros, caracterizados pela presença de grânulos específicos maduros (com cristalóide) (Figura 7A-C).

Eosinófilos murinos maduros e imaturos apresentam núcleo em forma de anel, ocupando grande parte do citoplasma, conforme visto por microscopia de luz (Figura 6) (LEE; JACOBSEN; OCHKUR; MCGARRY *et al.*, 2012). A análise das características ultraestruturais nucleares no 14^o dia de cultura revelou maiores detalhes destes núcleos. Núcleos de eosinófilos imaturos mais jovens mostram-se mais eucromáticos, mais "arredondados" e aparentemente mais volumosos (Figura 7A) em comparação com eosinófilos imaturos em processo de

diferenciação mais avançada e com eosinófilos maduros, os quais mostram núcleos "retorcidos" (Figura 7D). Estes núcleos "retorcidos" aparecem em secções celulares como lóbulos individualizados (Figura 7B-D). Nota-se também que, à medida que o eosinófilo amadurece, as áreas de heterocromatina e eucromatina tornam-se mais evidentes (compare a Figura 7A e 7B-D). Análises quantitativas mostraram uma tendência em redução da área ocupada pelo núcleo no citoplasma, embora não houve diferença significativa quando eosinófilos imaturos foram comparados com maduros (Figura 7E). Além disso, a área de retículo endoplasmático mostrou-se significativamente maior em eosinófilos imaturos comparados com maduros enquanto a área ocupada por complexo de Golgi não se alterou (Figura 8).

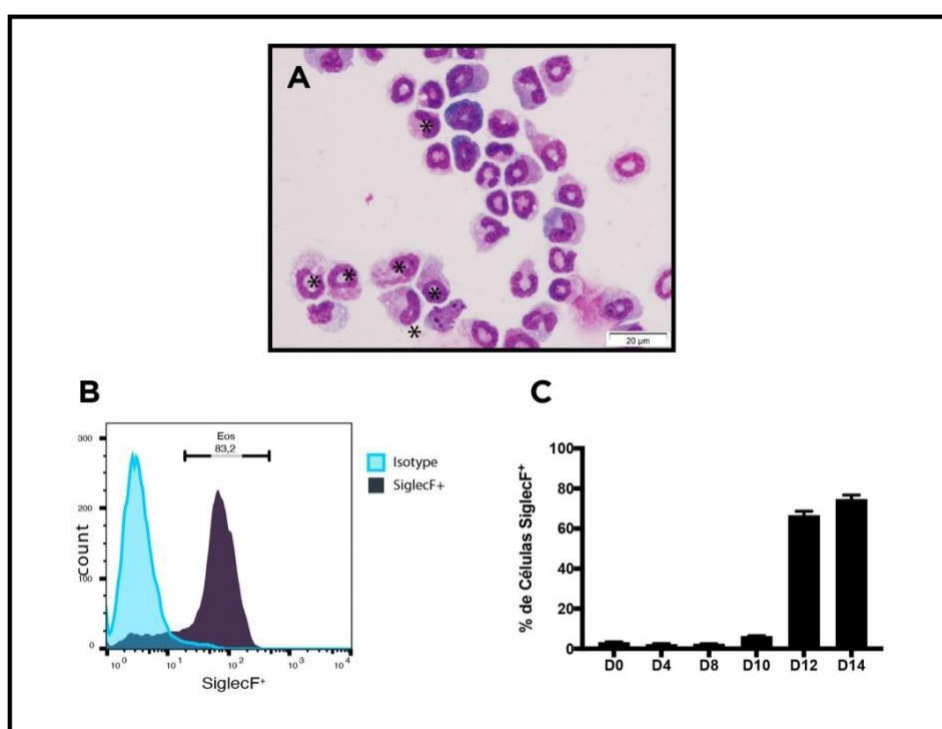


Figura 6- Células obtidas do lavado de medula óssea de animais Balb/C foram mantidas em cultura por 14 dias na presença de FLT3l, SCF e IL-5 para diferenciação de eosinófilos (BMEos). (A) Células obtidas no dia 14 da cultura, coradas com panótico e observadas por microscopia de luz. (B) Citometria de fluxo e (C) Gráfico da porcentagem de células coletadas em diferentes dias da cultura (0,4,8,10,12 e 14) marcadas com Siglec F mostrando aumento da positividade ao longo de 14 dias.

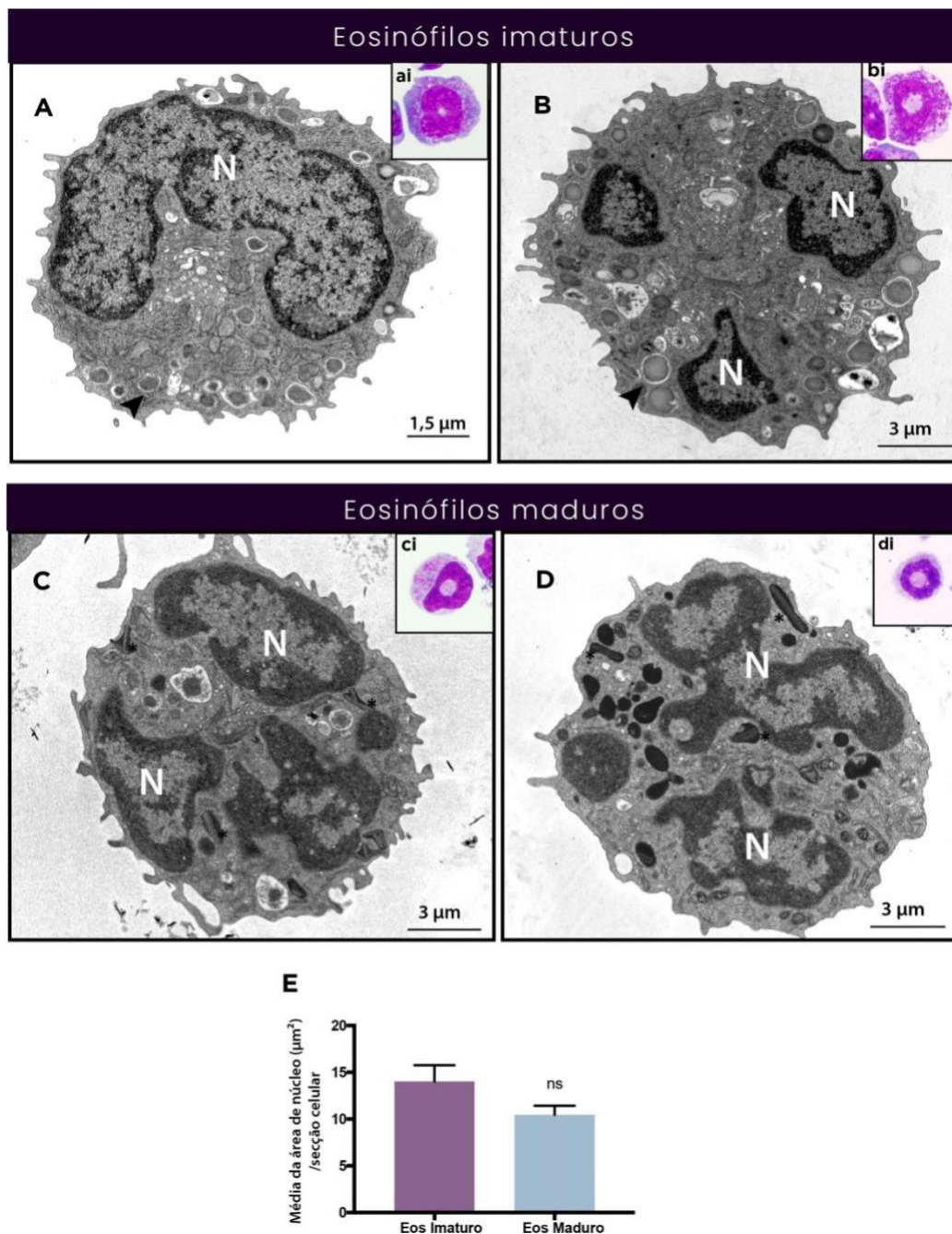


Figura 7 – Características ultraestruturais de eosinófilos murinos imaturos e maduros. (A, B) Imagens representativas de eosinófilos imaturos mostrando grânulos imaturos (sem cristaloide) em processo de formação (cabeça de seta). Note núcleo mais volumoso em (A), célula imatura mais jovem, em comparação com (B). (C, D) Eosinófilos maduros são observados com grânulos apresentando núcleo cristalino em conjunto com grânulos imaturos. (E) Gráfico da média da área do núcleo ocupando o citoplasma. N: Núcleo; (*) grânulos específicos maduros; ns: não significativo.

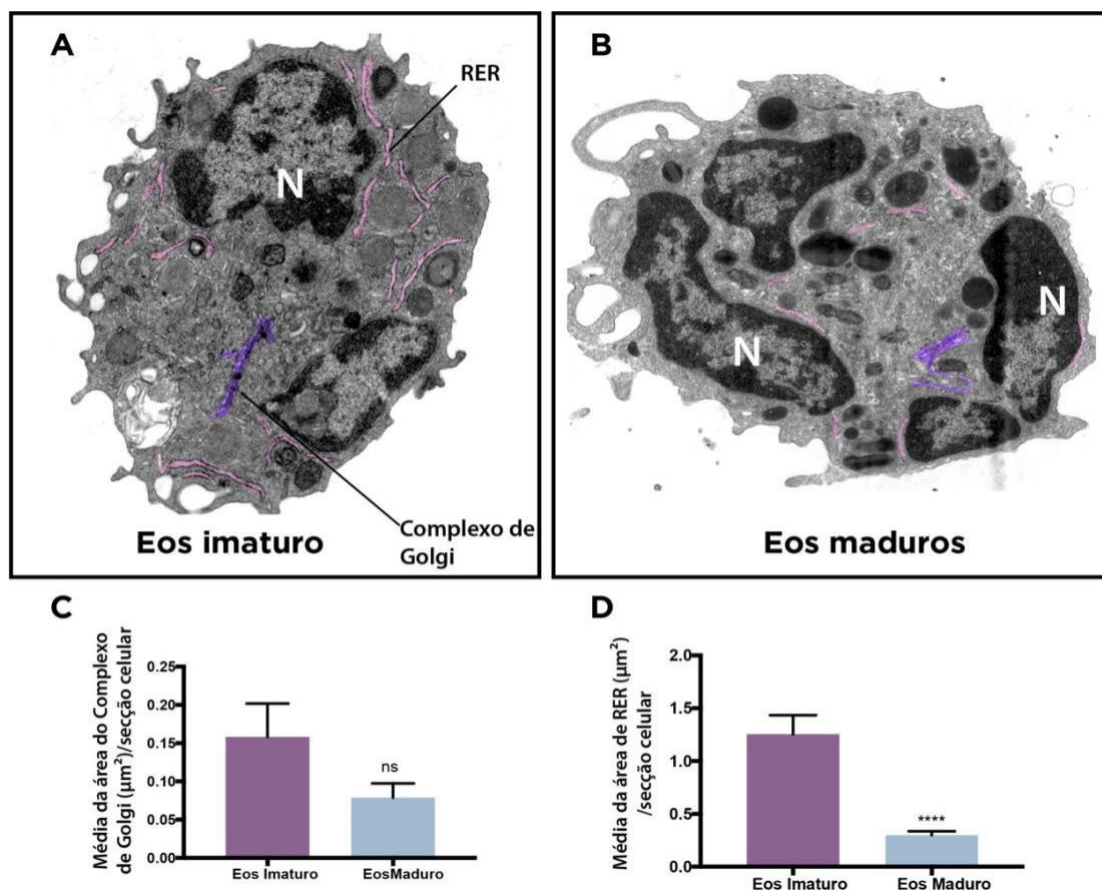


Figura 8- Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) e complexo de Golgi em eosinófilos murinos em cultura. (A) Micrografias eletrônicas representativas de um eosinófilo imaturo (B) e um maduro (C) mostrando cisternas do RER (destacadas em rosa) e complexo de Golgi (destacadas em roxos). Note que a quantidade de RER é menor no eosinófilo maduro. (C) Gráfico da média da área do complexo de Golgi ocupando o citoplasma. (D), Gráfico da média da área de RER ocupando o citoplasma. N: Núcleo; ns: não significativo. (****): $P < 0.0001$.

3.2 Aspectos ultraestruturais da granulogênese em eosinófilos derivados da medula óssea

Uma vez estabelecidas as características gerais dos eosinófilos de camundongos em culturas por MET, nós investigamos o processo de maturação dos grânulos secretores. Para tal, células coletadas ao longo dos diferentes pontos da cultura foram investigadas. Um total de 68 células mostrando o perfil celular inteiro, núcleo e presença de grânulos grandes no citoplasma, com morfologia compatível com a linhagem eosinofílica foi então analisado qualitativa e quantitativamente.

O processo de granulogênese foi estudado em um total de 697 grânulos observados no citoplasma destes eosinófilos em processo de diferenciação.

Fundamentalmente, duas populações de grânulos foram identificadas: (i) grânulos imaturos sem núcleo cristalino e (ii) grânulos maduros com um núcleo cristalino central circundado por uma matriz (Figura 9). Grânulos imaturos em processo de maturação apresentaram diferentes morfologias e foram classificados de acordo com o aspecto de seus conteúdos em: SGI (*specific granule type 1*) - grânulos de diferentes tamanhos com conteúdo heterogêneo e/ou presença de vesículas no lúmen; SGII (*specific granule type 2*)- grânulos com conteúdo predominantemente homogêneo e elétron-denso ocupando completamente ou parcialmente a área granular (Figura 9). Os grânulos maduros contendo cristalóides são aqui referidos como SGIII (*specific granule type 3*).

Os grânulos SGI mostraram-se em processo de condensação, ou seja, observamos que nestes grânulos ocorria um aumento gradativo de seus conteúdos heterogêneos (estruturas membranosas, vesículas e massas elétron-densas) e compactação dos mesmos (Figura 9). As vesículas encontradas dentro destes grânulos foram visualizadas se fundindo com massas elétron-densas frequentemente vistas na região central dos grânulos, sugerindo que essas vesículas auxiliam no processo de condensação (Figura 9C). Além disso, as análises em alta resolução mostraram evidência de brotamento de vesículas a partir da membrana limitante do grânulo (Figura 9C). Interessantemente, vesículas citoplasmáticas, provavelmente oriundas do complexo de Golgi, foram observadas em fusão com grânulos SGI (Figura 9D). Os grânulos SGII mostraram-se em processo de cristalização, ou seja, observamos que a partir destes grânulos ocorria o processo gradativo de formação do núcleo cristalino (Figura 10).

O diâmetro dos grânulos específicos encontrados nas populações de eosinófilos imaturos e maduros em cultura foi bastante variado (Figura 10A). As análises quantitativas por MET identificaram que o diâmetro dos grânulos SGI variou de 0,27 μm a 1,25 μm ; SGII de 1 μm a 0,5 μm e maduro de 0,4 a 0,3 μm (Figura 10). No entanto, quando as áreas dos grânulos foram examinadas, observou-se que, à medida que o grânulo amadurece, o tamanho do mesmo diminui (Figura 10). Em média, os grânulos SGI mostraram-se significativamente maiores em comparação com a população de grânulos SGII e maduros (0.27 ± 0.01 , 0.20 ± 0.01 , 0.12 ± 0.004 , $n = 363$, 297 e 213 , média \pm EPM de SGI, SGII e maduro respectivamente, $P < 0.001$ e $P < 0.0001$) (Figura 10B).

A distribuição dos grânulos específicos no citoplasma de eosinófilos imaturos e maduros também foi investigada. As análises quantitativas mostraram que nos

eosinófilos imaturos, as proporções médias de grânulos SGI e SGII foram respectivamente 75% e 25%, enquanto nos eosinófilos maduros, estas proporções correspondiam a 35% e 38% (Figura 10C). Nos eosinófilos maduros, a proporção média de grânulos com cristalóide (SGIII) foi de 27 % (Figura 9C).

3.3 Grânulos imaturos contêm um sistema membranoso interno

As análises por MET convencional dos grânulos específicos imaturos revelaram a presença de vesículas e outras estruturas membranosas dentro dos grânulos SGI em processo de maturação (Figura 9). Para entender melhor a organização dessas membranas intragranulares, foi usada a tomografia eletrônica, ferramenta que permite visualizar estruturas em 3 dimensões a nível ultraestrutural (Melo et al, 2005, Melo et al., 2013).

A aplicação de tomografia eletrônica e modelagem computacional revelou que as vesículas observadas em duas dimensões representavam na realidade cortes transversais de túbulos membranosos com diâmetro médio de 10nm (Figura 11). Esses túbulos estavam distribuídos em todo o espaço intragranular e misturavam-se com outros conteúdos do grânulo (Figura 10, cabeças de setas). Alguns túbulos mantinham contato com a membrana limitante do grânulo ou mostravam interconexão com outros túbulos (Figura 10E)

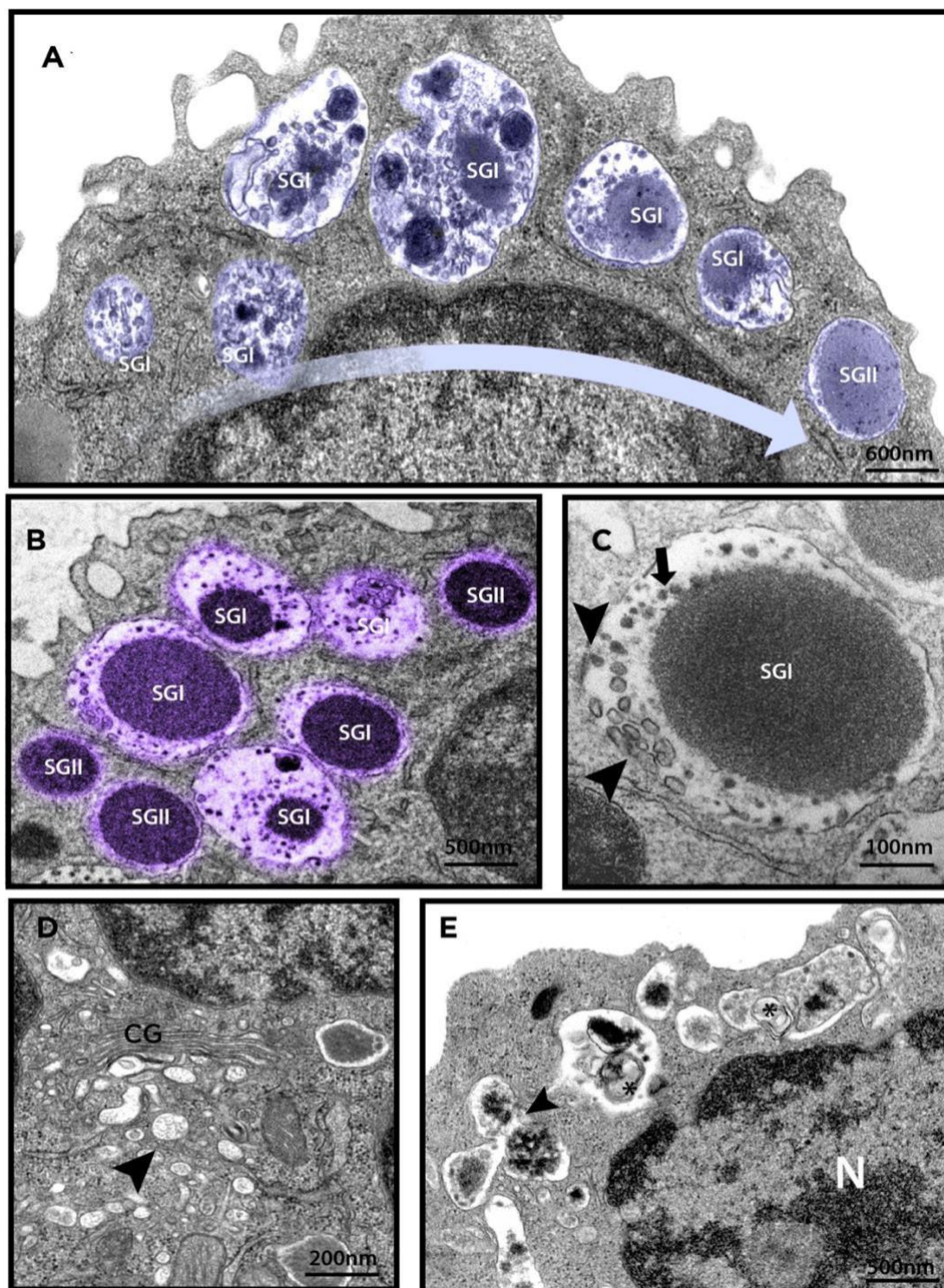


Figura 9 - Ultraestrutura dos grânulos específicos de eosinófilos murinos em cultura
 (A, B) Morfologia dos grânulos SGI e SGII, caracterizada por conteúdo predominantemente heterogêneo (SGI) ou homogêneo (SGII). Em (B), observe a presença de vesículas em grânulos SGI. Um destes grânulos é visto em maior aumento em (C). Note vesículas em contato com o conteúdo interno elétron-denso (seta) e com a membrana limitante do grânulo (cabeças de seta). (D) Vesículas do complexo de Golgi (cabeças de seta) são visualizadas em (E), na proximidade de grânulos secretores em processo de formação. CG: complexo de Golgi; N: Núcleo, SGI: grânulo específico imaturo em processo de condensação, SGII: grânulo específico imaturo em processo de cristalização.

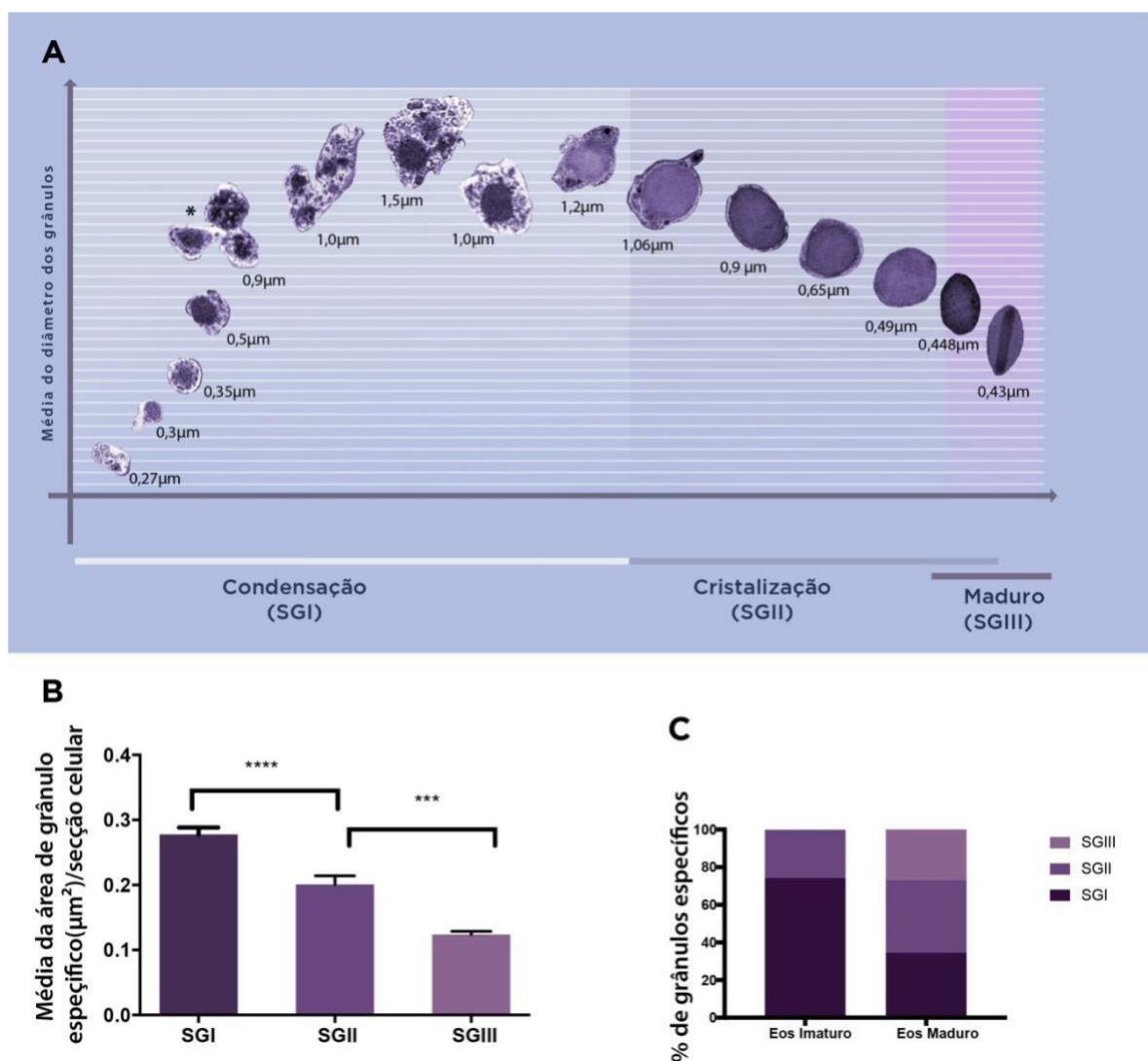


Figura 10 - Biogênese dos grânulos secretores do eosinófilo murino. (A) Imagem ilustrativa mostrando a sequência da formação dos grânulos específicos de eosinófilos murinos em cultura. Estes grânulos passam por processo de condensação (SGI) e cristalização (SGII), culminando com a formação de cristalóide interno (SGIII). Os diâmetros granulares variam de 0,27 µm a 1,5 µm. (B) A área dos grânulos reduz significativamente à medida que o grânulo amadurece. (C) Gráfico da porcentagem de grânulos específicos entre eosinófilos imaturos e maduros. (****) $P < 0.0001$; (***) $P < 0.001$. SGI: grânulo específico imaturo em processo de compartimentalização, SGII: grânulo específico imaturo em processo de compartimentalização. SGIII: grânulo maduro (com cristalóide).

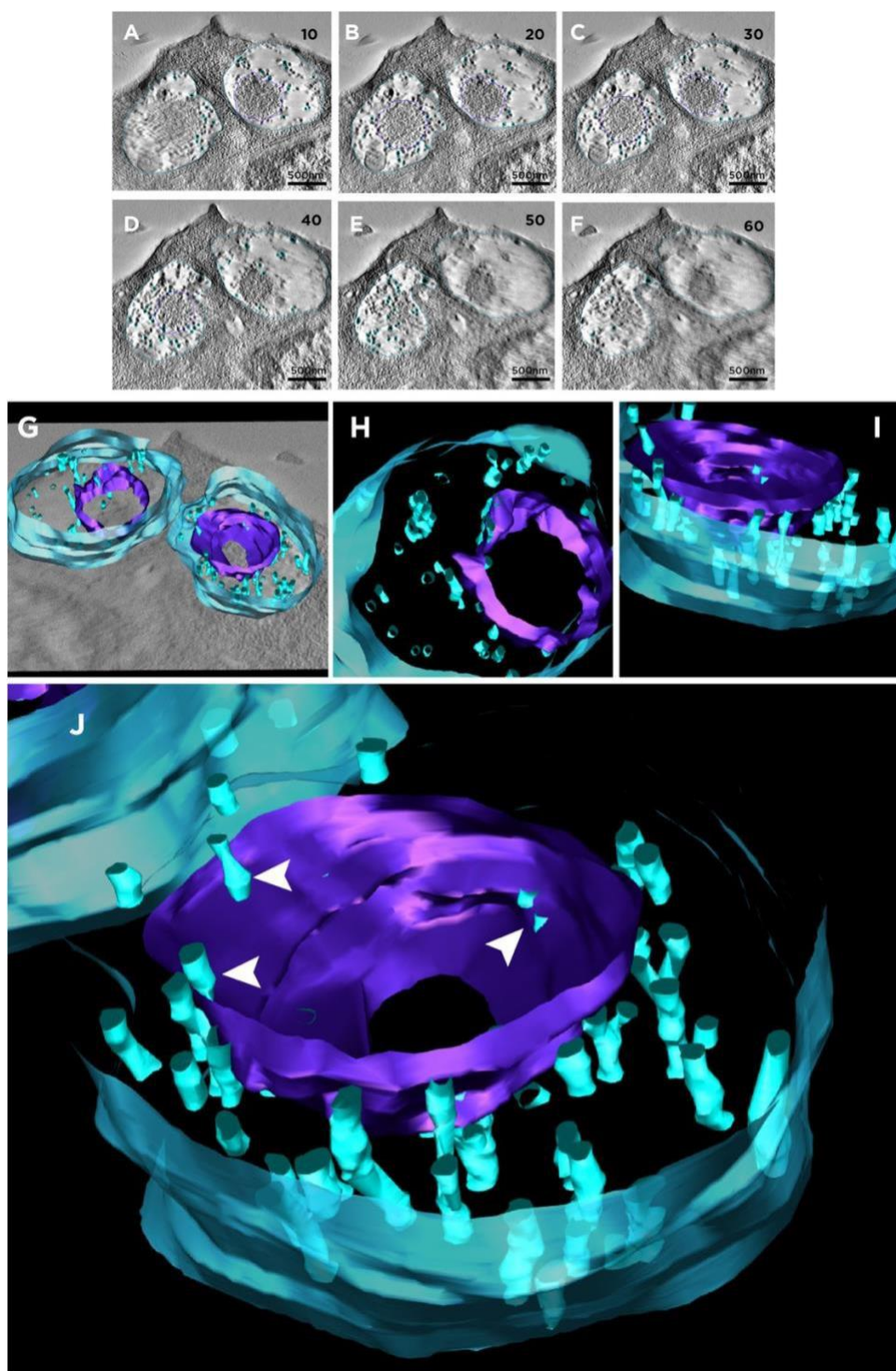


Figura 11- Reconstrução em 3D do sistema membranoso intragranular dos grânulos imaturos SGI. (A-F) Sequência de imagens obtidas por tomografia eletrônica de grânulos SGI nas quais foram delimitadas a região central elétron-densa (roxo) e sistema membranoso (azul claro). (G) reconstrução do volume gerado no tomograma. Note em (H-I), a presença de estruturas tubulares distribuídas na área interna do grânulo. Essas formações tubulares foram visualizadas também na proximidade da membrana limitante do grânulo. Em H, notam-se túbulos (cabeças de setas) em meio ao conteúdo central elétron-denso. Números nos painéis A-F correspondem imagens representativas da sequência de imagens seriadas obtidas no tomograma.

3.4 A suplementação da cultura com SCF gera mais grânulos maduros

SCF é uma citocina reconhecida pelo seu papel na maturação de células precursoras de leucócitos (HOFER; VACEK; POSPISIL; WEITEROVA *et al.*, 2006). Usualmente, esta citocina é utilizada no dia 0 da cultura para iniciar a diferenciação destas células (DYER, K. D.; MOSER, J. M.; CZAPIGA, M.; SIEGEL, S. J. *et al.*, 2008). Tendo em vista que observamos apenas 12% de grânulos maduros (com cristalóide) no dia 14 da cultura, nós investigamos se a suplementação de SCF durante a cultura seria capaz de aumentar a formação de grânulos maduros. Desta forma, culturas adicionais de eosinófilos receberam suplementação nos dias 4, 8, 10 e 12. Amostras de eosinófilos foram então processadas para MET no dia 14 da cultura e comparadas com amostras obtidas sem suplementação no mesmo tempo de cultura.

A cultura suplementada com SCF (D14SCF) não apresentou aumento significativo do número de eosinófilos quando comparada à cultura convencional (D14) ($31.10^6 \pm 5,2$ e $36.10^6 \pm 4,4$, $n=5$ culturas, D14 e D14SCF respectivamente) (Figura 12A). No entanto, quando as células foram analisadas por MET, foi observado um número maior de eosinófilos com grânulos maduros (SGIII) no citoplasma (Figura 12B). Análises quantitativas mostraram que, enquanto a cultura D14 tinha 12,5% de eosinófilos maduros, após suplementação esse número aumentou quase 100% (Figura 12C). Além disso, os números de grânulos SGI e SGII em eosinófilos maduros sofreram alteração. Enquanto na cultura convencional esses números foram 21% e 53%, respectivamente, na cultura suplementada por SCF, representavam 5% e 42%. Grânulos SGIII representavam 25% e 52% em eosinófilos maduros das culturas convencional e suplementada, respectivamente. Isto significa que SCF acelera os processos de condensação e cristalização dos grânulos específicos imaturos.

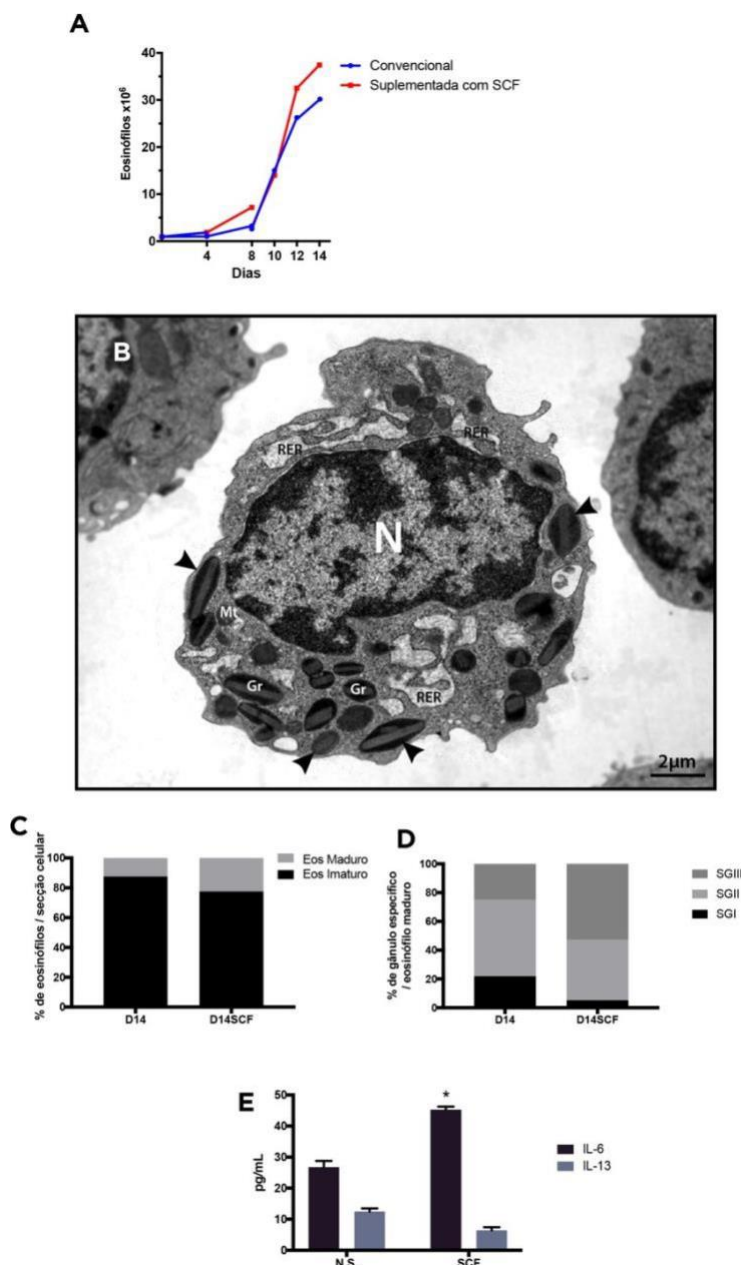


Figura 12- Efeito do SCF sobre eosinófilos murinos. (A) Número de eosinófilos em culturas convencionais e suplementadas com SCF. (B) Micrografia eletrônica representativa de eosinófilo coletado no último dia de cultura suplementada com SCF (D14SCF) mostrando grânulos específicos SGIII, caracterizados pela presença de núcleo cristalino (cabeças de seta). (C) Culturas suplementadas com SCF apresentaram aumento de 22,5% no número de eosinófilos maduros. (D) Porcentagem de grânulos específicos avaliada em eosinófilos maduros do dia 14 em culturas convencionais (D14) e suplementadas com SCF (D14SCF). (E) Níveis de interleucinas avaliados no sobrenadante após estímulo de eosinófilos com SCF. Eosinófilos no dia 14 foram estimulados por 1h com 100 ng/mL de SCF. N: Núcleo, Gr: Grânulo específico, Mt: mitocôndria, RER: Retículo Endoplasmático Rugoso.

ultraestruturais nos grânulos secretores em decorrência da desgranulação induzida por agonista, eosinófilos que foram estimulados com SCF ou apenas mantidos no meio de cultura por 1 h foram examinados por MET para identificação de alterações morfológicas dos grânulos específicos indicativas de secreção (Figura 13B-C).

A quantificação dessas alterações mostrou aumento significativo da proporção de grânulos com evidências de PMD (desestruturação do conteúdo e redução de elétron-densidade dos grânulos, sem ocorrência de fusão) nas células estimuladas em comparação com as não-estimuladas (Figura 13D). Além disso, EoSVs (Figura 14A), outro indicativo de PMD, foram observadas com números aumentados nas células estimuladas por SCF ($37,5 \pm 2,7$, média \pm EPM, $n = 17$) em comparação com as não estimuladas ($20,3 \pm 1,7$, média \pm EPM, $n = 17$) ($P < 0,001$) (Figura 14B). EoSVs foram particularmente observadas em torno de grânulos secretores em processo de esvaziamento de seus conteúdos (Figura 14C).

3.5 Eosinófilos murinos em cultura ativados por SCF secretam citocinas

A fim de obter mais informações sobre a influência de SCF em eosinófilos murinos, nós investigamos se SCF poderia induzir secreção destas células. Para isso, BMEos coletados no dia 14 da cultura convencional foram estimulados ou não com 100 ng/mL de SCF por 1h e os níveis de citocinas IL-4, IL-6 e IL-13 avaliados no sobrenadante. (BONJOUR, 2015; SHAMRI; MELO; YOUNG; BIVAS-BENITA *et al.*, 2012) Os níveis de IL-6 foram significativamente maiores no grupo tratado com SCF ($P < 0,05$), enquanto os níveis de IL-13 não se alteraram (Figura 12E). Por outro lado, não obtivemos expressão de IL-4 dessa proteína em nenhum dos grupos.

3.6 Eosinófilos humanos do sangue periférico estimulados por SCF secretam ECP e desgranulam por PMD

Após estudar os efeitos do SCF em eosinófilos murinos diferenciados a partir da medula óssea, nós buscamos responder se os eosinófilos humanos estimulados com SCF são capazes de secretar proteínas armazenadas nos grânulos. Já é bem estabelecido que os eosinófilos humanos estimulados por SCF liberam citocinas, mas a secreção de proteínas catiônicas ainda não foi documentada. Além disso, ainda são desconhecidos os mecanismos de desgranulação de eosinófilos humanos sob efeito de SCF. Primeiramente, medimos a presença de ECP no sobrenadante de eosinófilos obtidos do sangue periférico de doadores saudáveis e estimulados por 1h com diferentes doses de SCF. A ECP é uma RNase armazenada na matriz de grânulos e pode ser secretada durante asma e doenças alérgicas (Acharya e Ackerman 2014). Eosinófilos estimulados por SCF mostraram aumentos significativos de ECP dependente da dose, conforme medido pelo ensaio ELISA (Figura 13A). A resposta dose-dependente do SCF revelou que os eosinófilos na presença de 100ng/mL e 200ng/mL de agonista apresentaram um aumento significativo ($P < 0,05$) dos níveis de ECP comparado com células não estimuladas, mas não foi encontrada diferença significativa entre doses mais baixas ($P < 0,05$) (Figura 13A).

Após a confirmação de que os eosinófilos podem liberar ECP, avaliamos por quais mecanismos secretores ele poderia liberar o conteúdo armazenado em grânulos na presença de 100ng/mL de SCF. Para caracterizar eventos

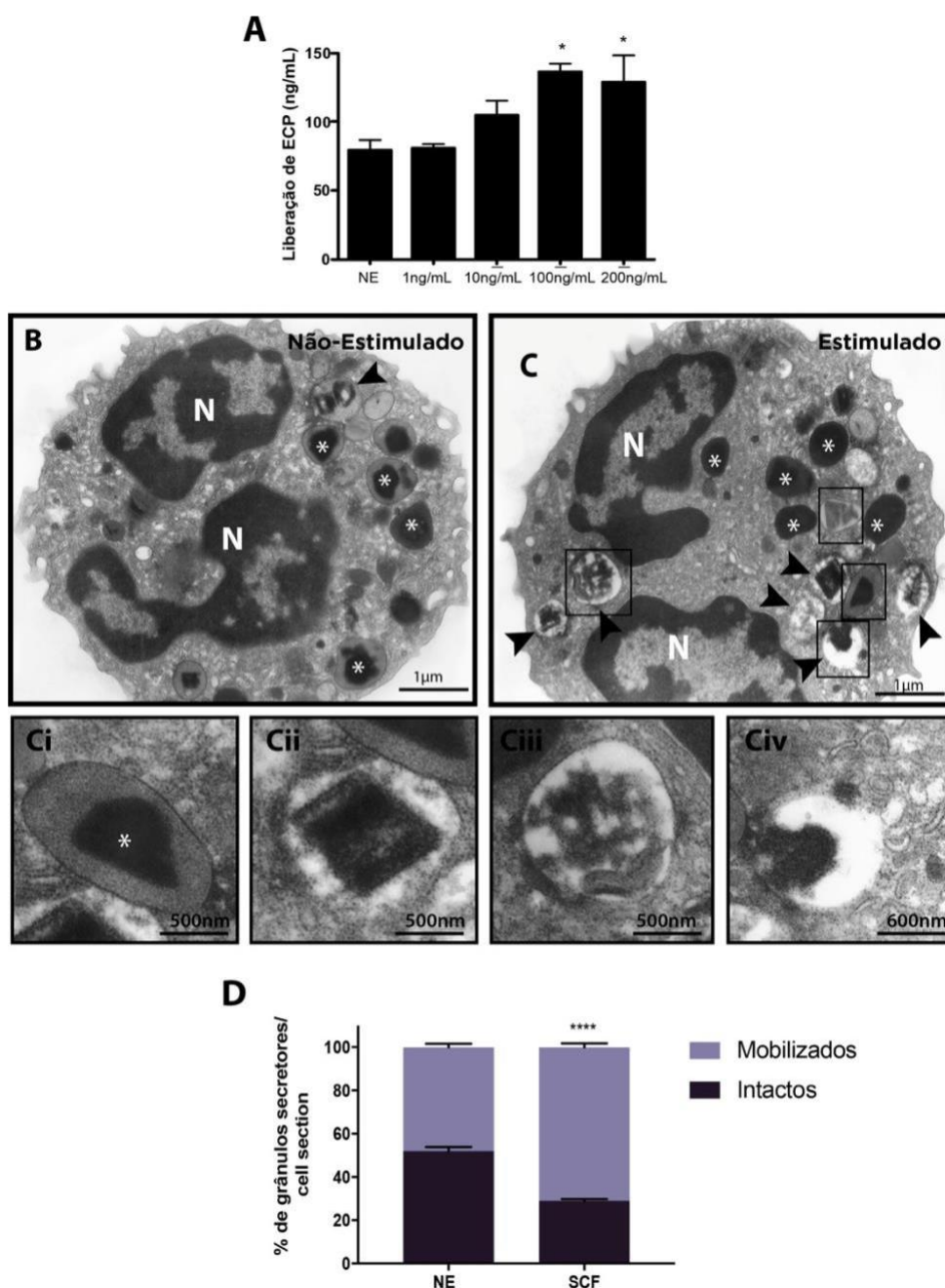


Figura 13- Eosinófilos humanos estimulados ou não por SCF. (A) Liberação de proteína catiônica ECP de eosinófilos induzida por rhSCF (1, 10, 100, 200 ng / ml) após 1 hora de estimulação a 37°C. (B) Ultraestrutura de eosinófilo não estimulado. (C) Ultraestrutura de eosinófilo estimulado com SCF apresentando grânulos em processo de PMD. (Ci-Civ) Note, em comparação com um grânulo intacto (Ci), a ocorrência de aumento de elétrons-densidade na matriz (Cii) e desestruturação do cristalóide (Ciii e Civ). (D) Porcentagem de grânulos mobilizados (em processo de esvaziamento) e de grânulos intactos nos grupos não estimulado (NE) e estimulado com SCF. Cada coluna representa a média + E.P.M. de pelo menos 3 experimentos independentes. (*) $P < 0,05$, (****) $P < 0,001$, quando comparado ao grupo não estimulado (NE).

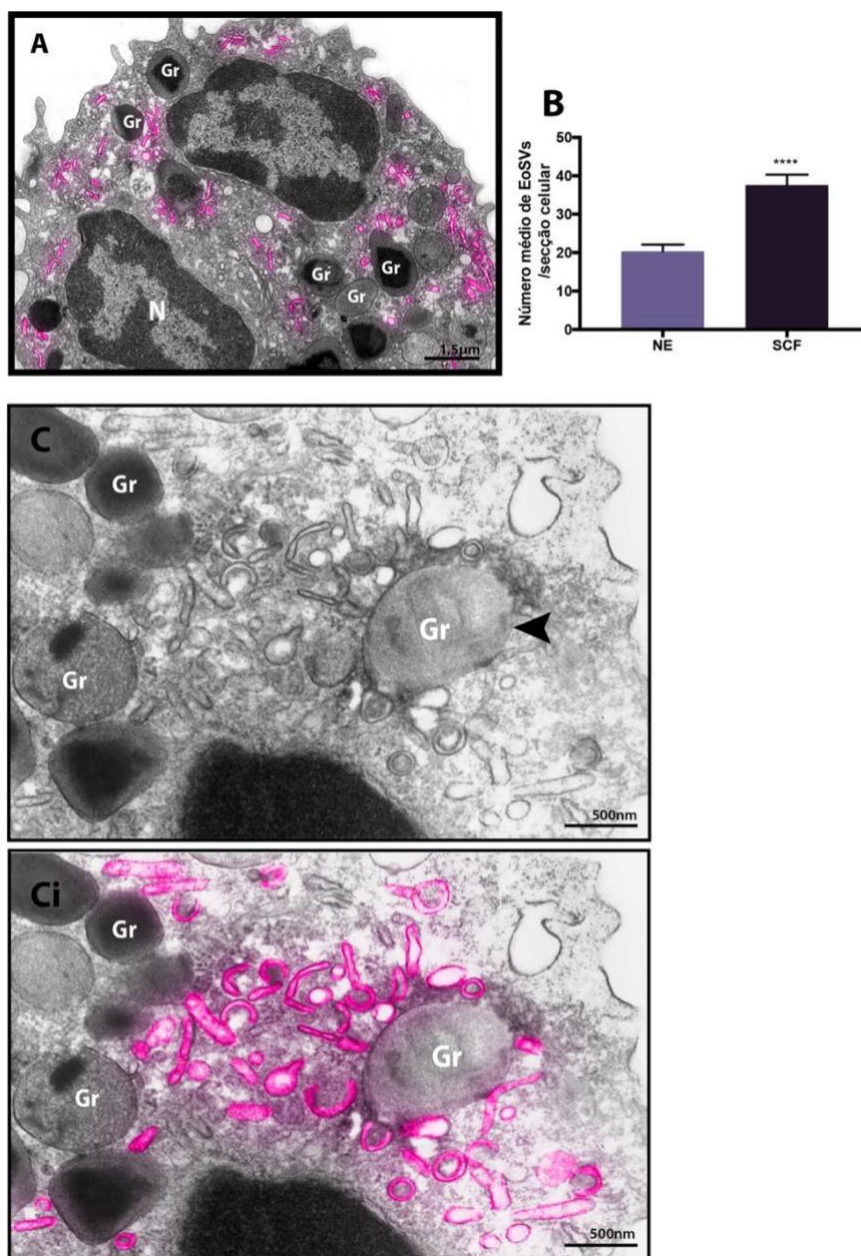


Figura 14- Eosinófilos humanos estimulados com SCF aumentam o número de EoSVs. (A) Ultraestrutura de eosinófilos ativados por SCF exibindo EoSVs (destacadas em rosa). (B) Células ativadas apresentaram aumento significativo do número médio de EoSVs no citoplasma em comparação com células não estimuladas. (C) Um grânulo em processo de secreção por PMD (seta) é observado em maior aumento. Note a presença de grande número de EoSVs na proximidade deste grânulo. Gr: Grânulos secretores, (****) $P < 0.001$.

3.7 Injeções subcutâneas de SCF induzem citólise e PMD em eosinófilos humanos teciduais

Uma vez caracterizado o processo de secreção de eosinófilos em resposta à SCF *in vitro*, avaliamos se os eosinófilos teciduais, estimulados *in vivo*, apresentavam características semelhantes. Para tal, utilizamos biópsias da pele de três pacientes, os quais receberam administração subcutânea de SCF, conforme estudo anterior (Dvorak, Costa et al. 1998). Este tratamento provoca inflamação dérmica caracterizada por infiltração de granulócitos (Dvorak, Costa et al. 1998). Uma área de 6.240 μm^2 de tecido da biópsia foi estudada por MET. Primeiramente, confirmamos infiltração de eosinófilos, juntamente com outras células do sistema imune como mastócitos, neutrófilos e linfócitos (Figura 15A).

Os eosinófilos estavam localizados em áreas perivasculares e associados a depósitos intersticiais de colágeno (Figura 15A). Estas células mostraram evidências morfológicas de desgranulação por PMD e citólise (Figura 15B). Análises quantitativas revelaram que 52% do número total de eosinófilos no tecido exibia sinais morfológicos de PMD, enquanto os outros 48% mostravam sinais de citólise (Figura 15B). Não encontramos sinal de exocitose nos eosinófilos. A citólise dos eosinófilos foi caracterizada pela ruptura da célula, seguida da deposição de grânulos secretores e material nuclear no espaço extracelular. Além disso, nas amostras de biópsias obtidas, identificamos 189 grânulos livres depositados aleatoriamente ao longo de todo o tecido, juntamente com fragmentos celulares (Figura 15B). Muitos desses grânulos secretores foram encontrados próximos a depósitos de colágeno ou a outros leucócitos (Figura 15B).

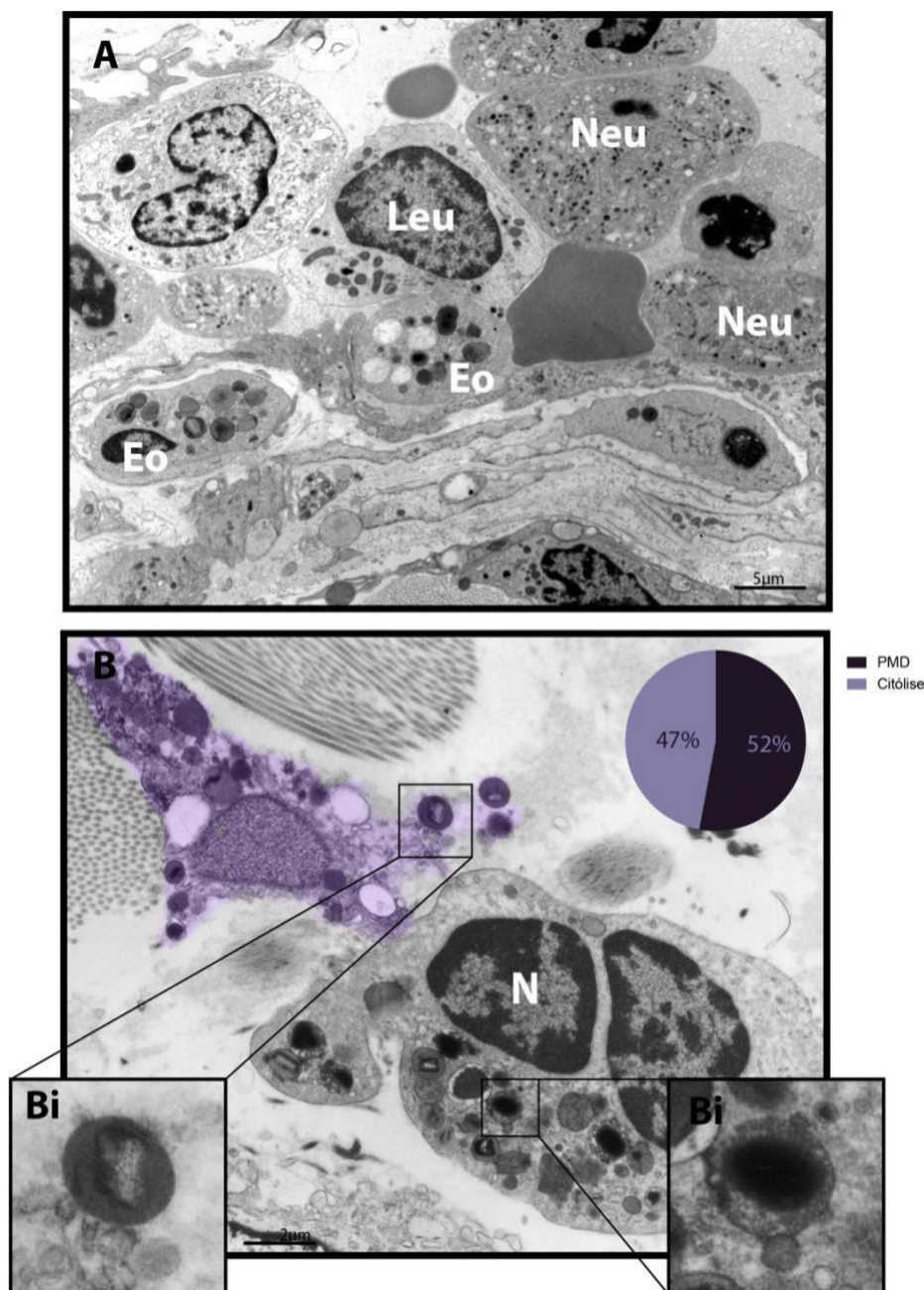


Figura 15- Eletromicrografia de biópsias de pele humana coletadas do local de administração de rhSCF. (A) infiltrado inflamatório do sítio de administração de SCF com presença de eosinófilos (Eo), neutrófilo (Neu) e linfócitos (Leu) localizados na região perivascular. (B) Eosinófilos do infiltrado inflamatório realizando citólise (roxo) representou 47% das células analisadas enquanto 53% estavam em PMD. Em maior aumento, observam-se grânulos com sinais de perdas sendo depositados no tecido (Bi) ou dentro de células realizando PMD (Bii). N: Núcleo.

3.8 Grânulos secretores depositados no sítio inflamatório liberam EoSVs

Durante as análises ultraestruturais de eosinófilos humanos, observamos em áreas de biópsias com eosinófilos citolíticos, a ocorrência de EoSVs íntegras na proximidade de grânulos extracelulares livres (Figura 16A e B). Desta forma, questionamos se estas vesículas poderiam ser formadas a partir dos grânulos livres. Para isso, nós analisamos por tomografia eletrônica, as mesmas amostras de tecido avaliadas por MET convencional (Figura 17). As reconstruções em 3D e os modelos gerados a partir das secções mostraram que EoSVs, caracterizadas como vesículas tubulares encurvadas, com diâmetros transversais de aproximadamente 150-300 nm, mantinham íntima associação com grânulos em processo de esvaziamento (Figura 17B e C). Estes dados sugerem que EoSVs podem ser formadas a partir dos grânulos mobilizados depositados no tecido (Figura 16C). Desta forma, grânulos com características de PMD parecem liberar EoSVs no sítio inflamatório.

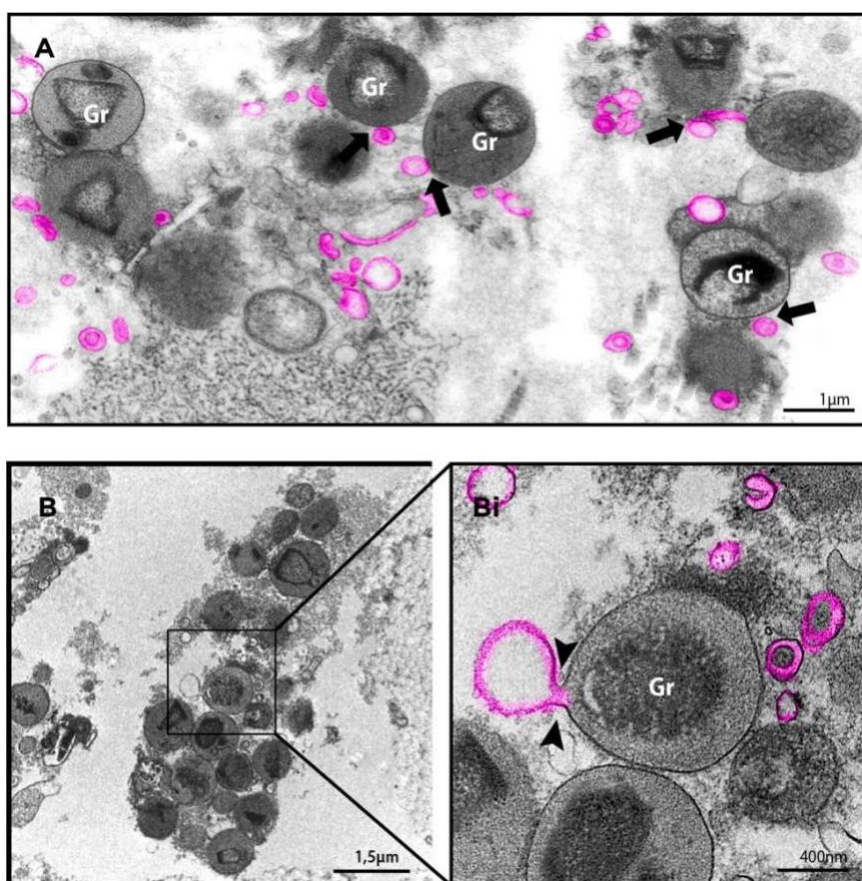


Figura 16 - EoSVs e grânulos secretores livres no espaço extracelular, observados na pele de pacientes em tratamento *in situ* com SCF. (A) Eletromicrografia mostrando EoSVs (destacadas em rosa) localizadas ao redor ou aderidas (setas) a grânulos secretores (Gr)

apresentando sinais de PMD). Note evidências de brotamento dessas vesículas a partir de grânulos secretores (Bi).

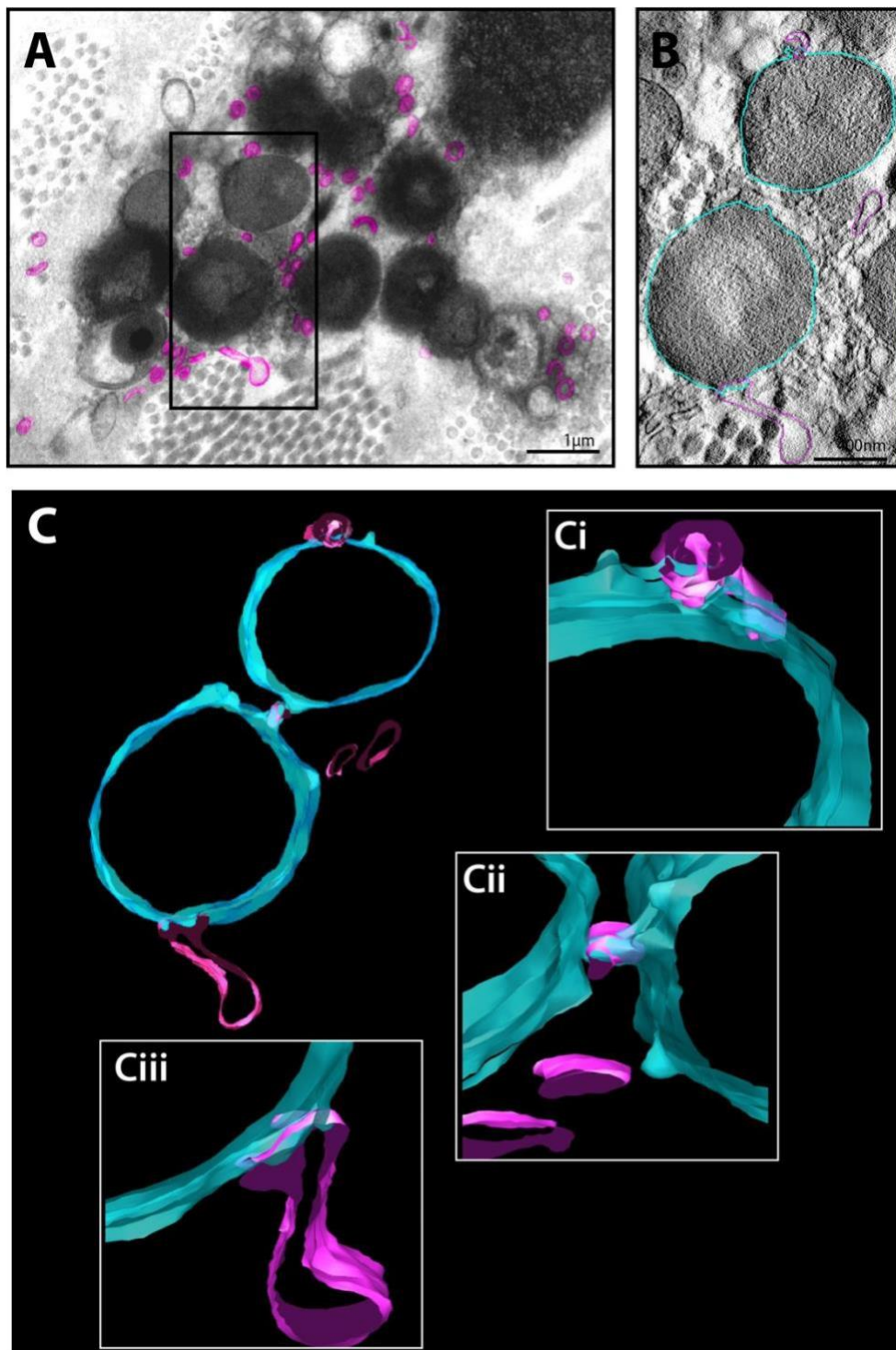


Figura 17- Análises tomográficas revelam formação de EoSVs a partir de grânulos livres em sítios inflamatórios. (A) Biópsias de pele humana (pacientes recebendo tratamento *in situ* com SCF) contendo eosinófilos citolíticos foram usadas para reconstrução de modelos em 3D. (B) Tomograma de grânulos secretores (azul) em contato com vesículas (rosa). (C) Reconstrução 3D do volume revelou o brotamento de EoSVs. Essas EoSVs foram encontradas permeando o limite da membrana, com projeções internas e externas no grânulo (Ci e Cii).

3.9 O processo de maturação de eosinófilos murinos leva à redução da população mitocondrial

Como último aspecto a ser abordado nesta tese, focamos no perfil mitocondrial de eosinófilos, pobremente compreendido em eosinófilos murinos. Para isso, amostras de eosinófilos ao longo da cultura (imaturos e maduros) foram processadas para microscopia confocal a laser (marcadas com a sonda *MitoTracker Red*) e MET. A população de mitocôndrias foi então quantificada em eletromicrografias usando o programa *ImageJ*. Nossos dados mostraram que a área ocupada por mitocôndrias no citoplasma reduziu significativamente em eosinófilos maduros em comparação com eosinófilos imaturos (Figura 18). Além disso, as análises em alta resolução revelaram que mitocôndrias são aptas a liberarem vesículas a partir da membrana externa (Figura 19), evento relacionado com a manutenção da viabilidade celular (CANTO, 2018).

3.10 Mitocôndrias de eosinófilos respondem a estímulos inflamatórios com alterações morfológicas

Em seguida, perguntamos se a população de mitocôndrias observada em eosinófilos no dia 14 da cultura, ponto onde se observa maior número de eosinófilos maduros, sofre alterações em número em resposta ao tratamento com estímulos inflamatórios. Para isso, estimulamos amostras de eosinófilos coletados neste dia da cultura com SCF, CCL11, TNF- α ou apenas meio durante 1h. As amostras foram em seguida processadas para MET e avaliadas quantitativamente conforme acima. Os resultados mostraram que a área ocupada por mitocôndrias aumentou significativamente em resposta a CCL11 e TNF- α , em comparação ao grupo controle (Figura 20A). Além disso, o tratamento com esses estímulos induziu alterações morfológicas significativas na população de mitocôndrias, tais como aumento da circularidade e da elétron-densidade da matriz mitocondrial (Figura 20). Aplicação de tomografia eletrônica computadorizada revelou que as mitocôndrias de eosinófilos ativados por CCL11 e TNF- α apresentavam redução de cristas mitocondriais em comparação com as mitocôndrias do grupo controle (Figura 21).

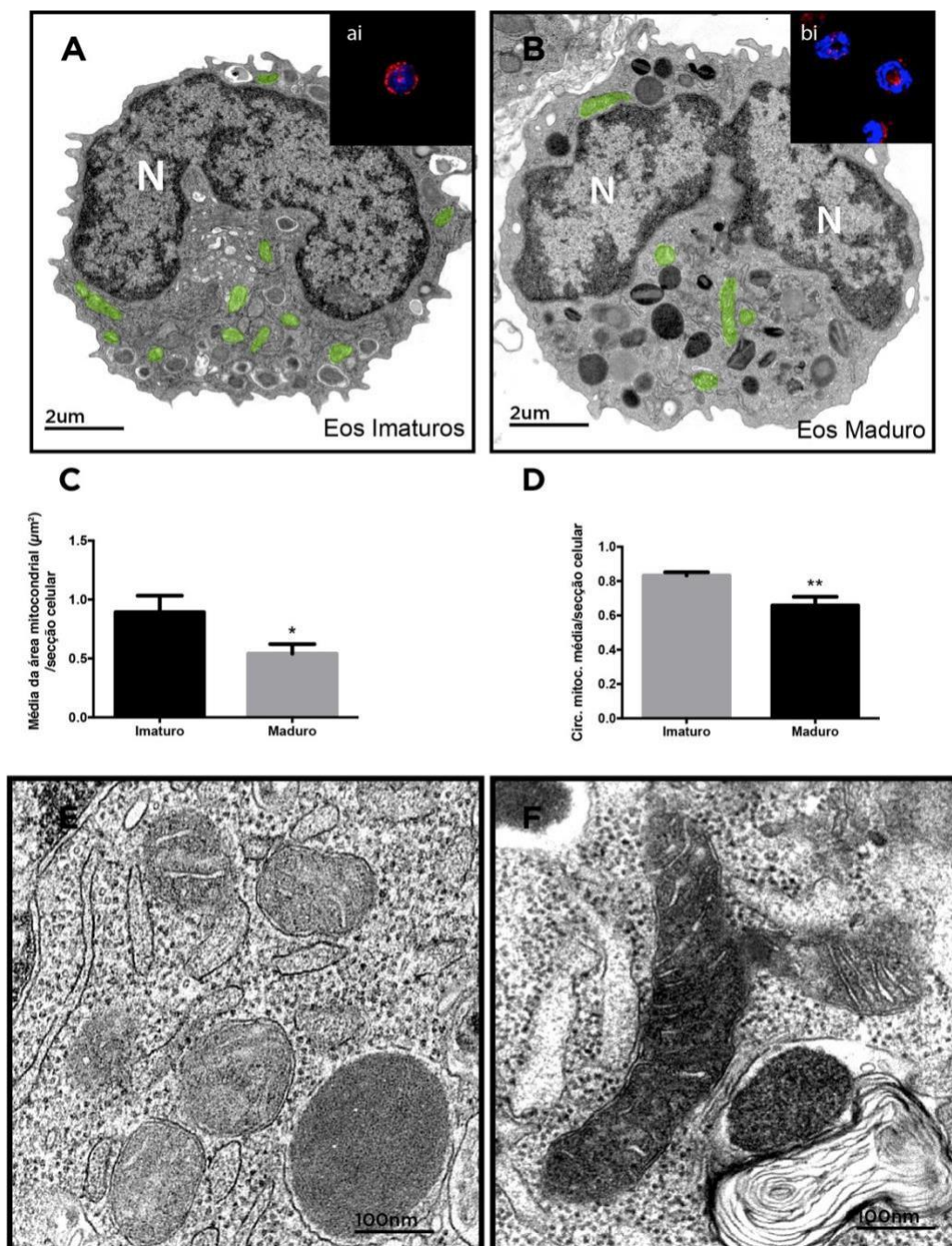


Figura 18- Área mitocondrial diminui ao longo do desenvolvimento de eosinófilos murinos. (A) Micrografias de eosinófilo imaturo obtido da cultura exibindo população de mitocôndria no citoplasma (destacada em verde). (B) Eosinófilo maduro mostrando poucas mitocôndrias no citoplasma. (ai, bi) eosinófilo marcado com *MitoTracker Red CMXO*. (C) Eosinófilos apresentam redução da área de mitocôndria à medida que tornam se maduros. (D) Média da circularidade (eixo horizontal/eixo transversal) mostra que o processo de maturação do eosinófilo promove alongamento das mitocôndrias. Enquanto mitocôndrias em eosinófilos imaturos são mais redondas (E), eosinófilos maduros apresentam mitocôndrias alongadas. N: Núcleo, (*) $P < 0.05$, (**): $P < 0.001$.

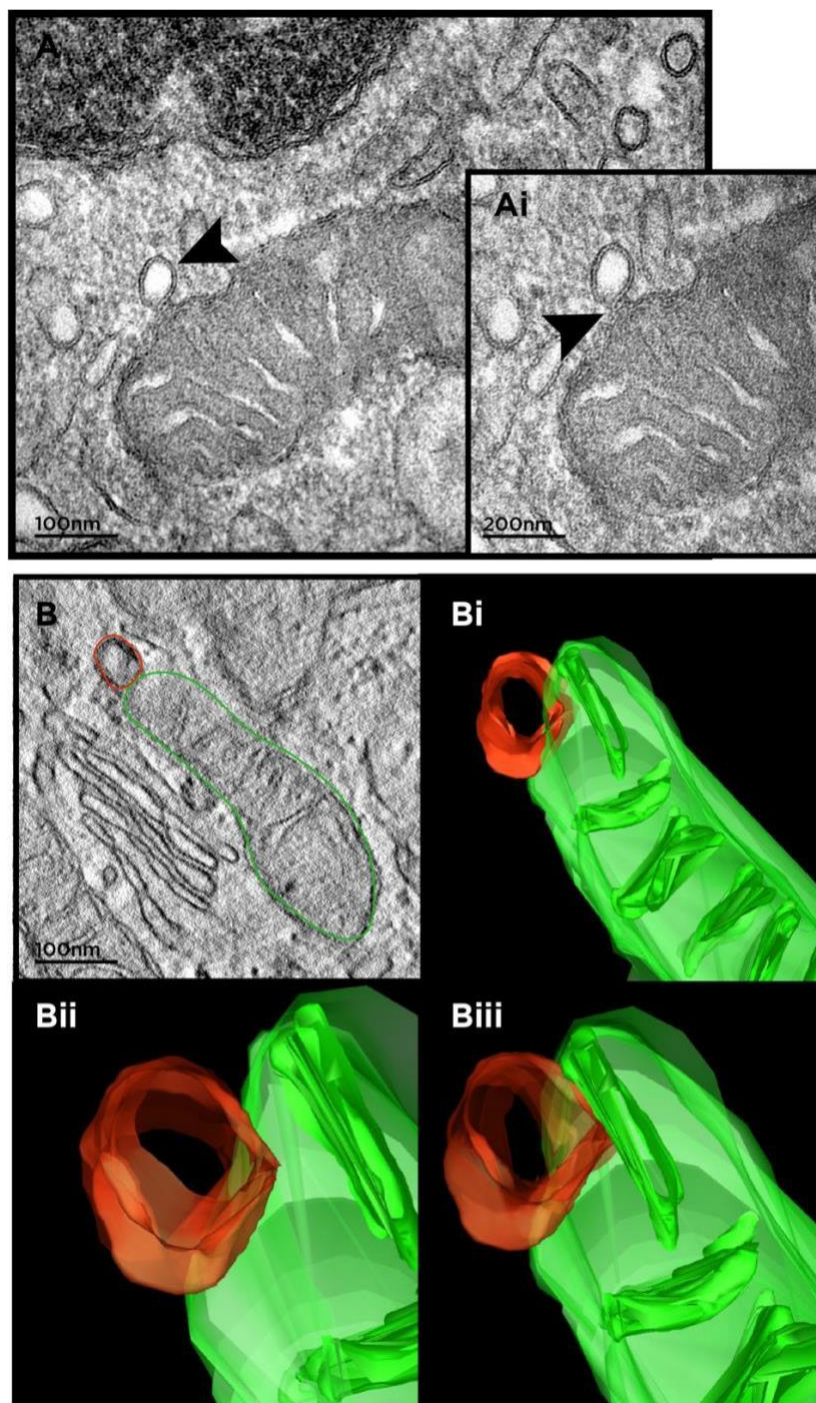


Figura 19– Mitocôndrias em eosinófilos imaturos liberam vesículas derivadas da membrana externa. (A) Ultraestrutura de mitocôndrias de eosinófilos imaturos apresentando brotamento de vesículas a partir da membrana externa (Ai, seta). (B) Tomografia eletrônica demonstra íntima associação de mitocôndrias e vesículas. Note nas reconstruções em 3D (Bi-Biii) que parte de uma vesícula em brotamento (destacada em laranja) é derivada do interior da mitocôndria (destacada em verde).

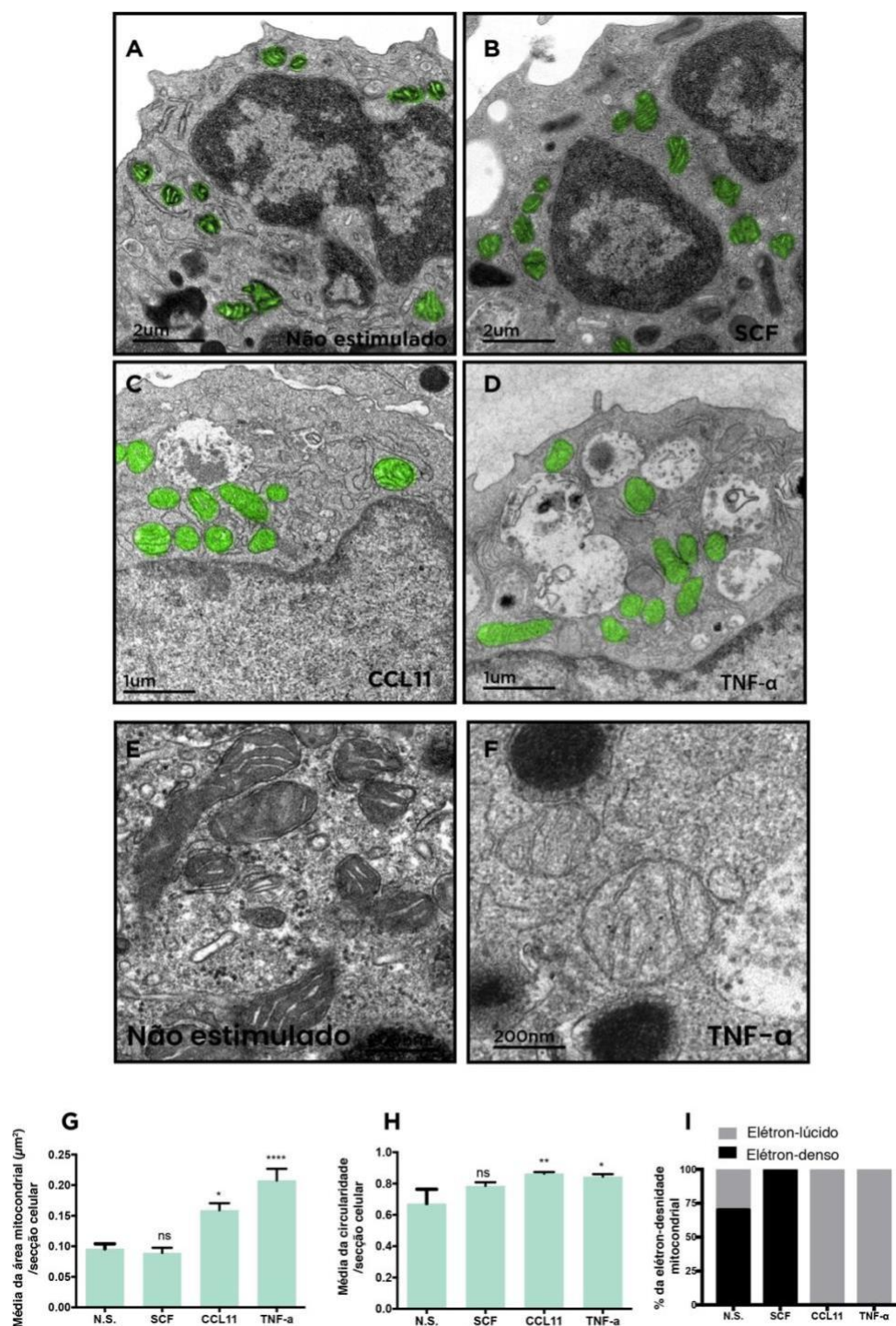


Figura 20 – Mitocôndrias de eosinófilos murinos respondem a estímulos inflamatórios

(A-F) Ultraestrutura da população mitocondrial de eosinófilos murino estimulados ou não com agonistas. Eosinófilo apenas na presença de meio (A) ou estimulados com SCF (B), CCL11 (C) ou TNF- μ (D). (E) Mitocôndrias alongadas obtidas de eosinófilos maduros. Observe que mitocôndrias na presença de TNF- μ exibem forma arredondada com diminuição da elétrons densidade. (G) Média da área mitocondrial aumenta significativamente nos grupos CCL11 e TNF- μ . (H) Média da circularidade (eixo horizontal/eixo transversal) mostra arredondamento da forma. (I), Elétron-densidade de eosinófilos estimulados com CCL11 e TNF- μ diminuem comparados ao grupo não estimulado. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$, (****) $P < 0,001$.

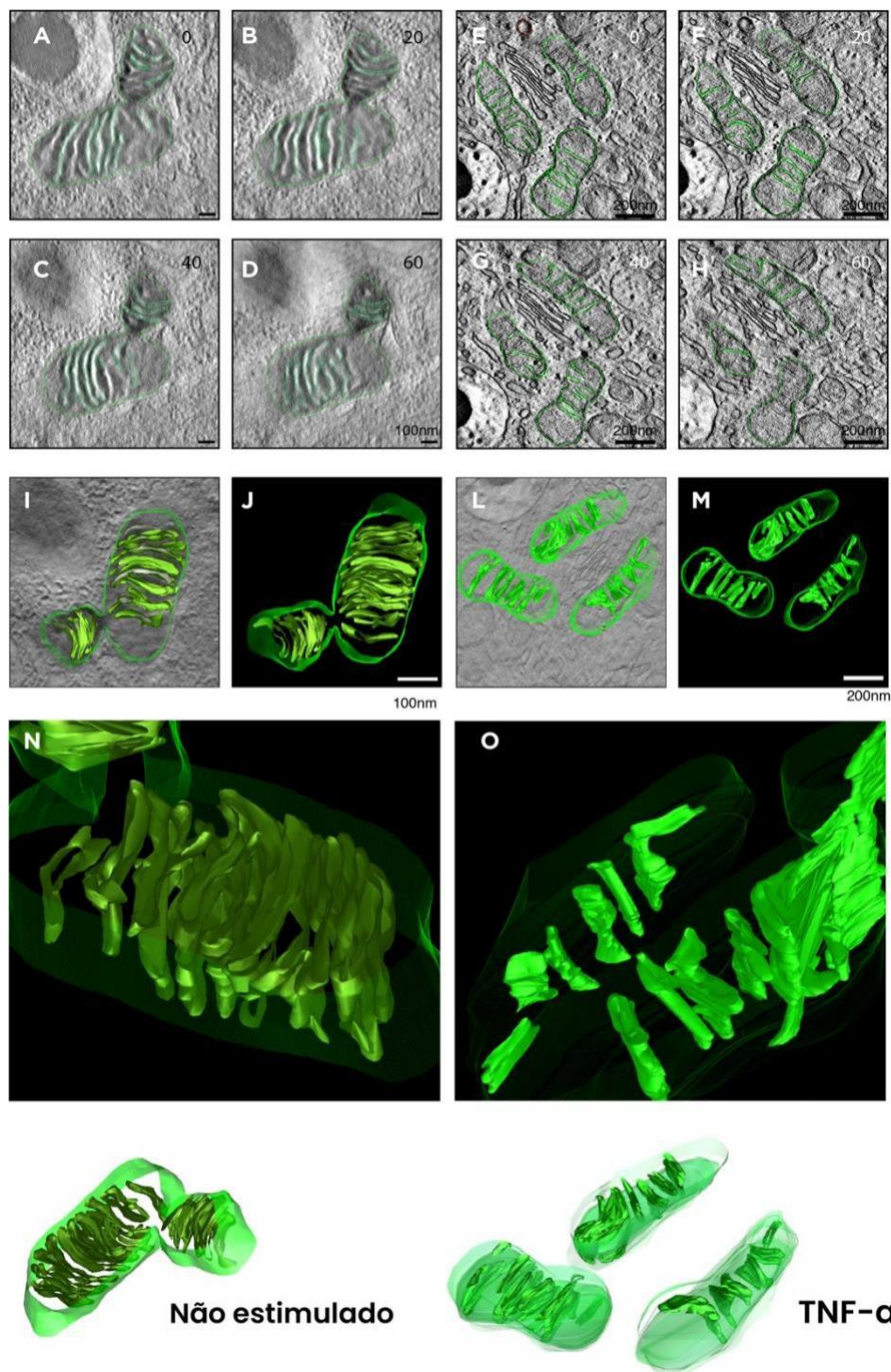


Figura 21– Elétron tomografia revela diminuição de cristas em eosinófilos murinos estimulados. (A-H) Sequência de imagens obtidas por tomografia eletrônica de mitocôndrias nas quais foram delimitadas as cristas mitocondriais e membrana limitante. (I, J) Reconstrução do volume gerado no tomograma de eosinófilos não estimulados. (L, M) Reconstrução do volume gerado no tomograma de eosinófilos estimulados com TNF- μ . Note em (N), a quantidade de cristas é maior comparada em eosinófilos estimulados com TNF- μ . Em eosinófilos estimulados com TNF- μ há um aumento da matriz mitocondrial com presença de poucas cristas. Números nos painéis A-F correspondem imagens representativas da sequência de imagens seriadas obtidas no tomograma.

4 DISCUSSÃO

Tradicionalmente, células com alta capacidade de secreção produzem proteínas através da rota clássica (síntese *de novo*), onde moléculas de RNAm saem do núcleo em direção ao RER para construir o primeiro molde da proteína. Em seguida, as proteínas são amadurecidas no complexo de Golgi e liberadas no meio extracelular. Diferente dessas células, eosinófilos ao longo do seu desenvolvimento são capazes de sintetizar e, simultaneamente, estocar proteínas antes de liberá-las (FULKERSON; ROTHENBERG, 2018; WILLEBRAND; VOEHRINGER, 2017). Quando maduros, essas células exibem em seu citoplasma grânulos com citocinas recém-sintetizadas, prontas para serem lançadas no sítio inflamatório. Esses grânulos apresentam morfologia distinta, com região central predominantemente cristalina (cristaloide), diferenciando o eosinófilo das demais células do sistema imune. Assim, essas organelas, com morfologia única e conteúdo pré-formado tornam-se palco de discussão de vários estudos, inclusive nesta tese.

Neste trabalho, utilizamos um conjunto de citocinas (Flt3L, SCF e IL-5) para obter uma cultura com 87% de eosinófilos em 14 dias. Os eosinófilos, assim obtidos, foram investigados por MET. Ao analisar a cultura em vários pontos (0, 4, 8, 10, 12 e 14), identificamos células com diversas características. Nós observamos que, eosinófilos mais jovens apresentavam o núcleo mais eucromático e volumoso quando comparados com eosinófilos totalmente diferenciados. Além disso, essas células mostravam uma redução do RER à medida que amadureciam. Ou seja, eosinófilos mais imaturos possuem característica de célula em alta produção de proteína. A eucromatina vista por MET, representa parte do DNA ativo na célula e, somados a grande quantidade de RER, indica que estas células estavam em intenso processo de produção. No entanto, os dados do presente trabalho mostram que apenas a morfologia do núcleo e volume de RER são insuficientes para definir o grau de maturação de eosinófilos murinos.

As mudanças na morfologia do núcleo e RER mostraram-se acompanhadas da formação dos grânulos específicos. Estudos em camundongos já demonstraram que a maturação dos grânulos específicos é intimamente associada com a diferenciação final de eosinófilos (BETTIGOLE; GLIMCHER, 2016;

MATTHEWS; MCMILLAN; COLBERT; LAWRENCE *et al.*, 2016). Por exemplo, a combinada deleção dos genes de MBP-1 e EPX causam falhas na eosinopoiese, levando a célula a entrar em apoptose (OCHKUR; DOYLE; JACOBSEN; LESUER *et al.*, 2017). Interessantemente, essas células apresentavam estruturas semelhantes a grânulos específicos, delimitados por membrana, mas desprovidos de núcleo cristalino. De acordo com essas investigações, foi demonstrado que um requisito proteolítico no processamento de proteínas catiônicas dos grânulos, incluindo MBP e EPX, é requerido tanto para a formação do grânulo quanto para a maturação da célula. Portanto, eosinófilos exibindo grânulo com cristalóide determina o estado de amadurecimento da célula.

À medida que amadurecem, os grânulos dos eosinófilos sofrem condensação e cristalização do seu conteúdo, possibilitando o desenvolvimento do cristalóide (MELO; WELLER, 2018). Aqui, este processo pôde ser confirmado observando a morfologia de mais de 650 grânulos em diferentes etapas. Eosinófilos imaturos apresentam mais grânulos em condensação/SGI, enquanto essa população diminui significativamente em eosinófilos maduros. Durante o processo de condensação são formadas estruturas tubulares membranosas, intimamente ligadas à membrana limitante e são aglomeradas na porção central do grânulo. Essas estruturas são visualizadas em 2D como vesículas pequenas (cerca de 10nm de diâmetro) acumulando e dando forma a estruturas maiores. Através da tomografia eletrônica, qual permite explorar organelas em 3 dimensões, foi possível mostrar que essas estruturas são interconectadas, tornando-se maiores à medida que aumentavam sua quantidade (Figura 11).

Durante esse processo, os grânulos SGI aumentam seu volume drasticamente, atingindo até 5 vezes mais do seu diâmetro inicial (Figura 10A). Após o processo de condensação, grânulos SGII (em cristalização) compactam consideravelmente seu volume, dando forma a um conteúdo homogêneo preenchendo toda a organela, para então seguirem à formação final do cristalóide. Por vários anos se discutia que eosinófilos possuíam duas diferentes populações, grânulos primários (sem núcleo cristalino) e grânulos secundários (com núcleo cristalino) (DVORAK; ISHIZAKA, 1994; ROSENBERG; DYER; FOSTER, 2013). No entanto, várias linhas de evidências têm indicado que grânulos primários não representa uma população de grânulos em separado. Por exemplo, é bem estabelecido que durante a formação do grânulo e na gênese da proteína catiônica, notavelmente a MBP, sofrem progressivos processamentos passando

da forma precursora (pro-MBP) para MBP, resultando na cristalização do núcleo da organela, configurando sua exclusiva morfologia (BARKER; GLEICH; PEASE, 1988; DVORAK, 1980). Estudos sobre a diferenciação de eosinófilos na presença de IL-5, revelando a localização das formas pró-MBP e MBP, mostrou que pró-MBP era restrita a grânulos sem o cristalóide enquanto grânulos com cristalóide continham as duas formas (POPKEN-HARRIS; CHECKEL; LOEGERING; MADDEN *et al.*, 1998). Outras proteínas catiônicas, como ECP e EPX, foram demonstradas em ambos tipos de grânulos (EGESTEN; CALAFAT; WELLER; KNOL *et al.*, 1997).

Vários registros têm sido feitos ao nível molecular sobre o desenvolvimento de eosinófilos. Diante disso, através de ferramentas de microscopia, nosso grupo vem contribuindo para o entendimento do eosinófilo (AKUTHOTA; CARMO; BONJOUR; MURPHY *et al.*, 2016; CARMO; BONJOUR; SPENCER; WELLER *et al.*, 2018; DIAS; AMARAL; MALTA; SILVA *et al.*, 2018; MACK; STEIN; ROME; XU *et al.*, 2019; MELO, R. C.; PEREZ, S. A.; SPENCER, L. A.; DVORAK, A. M. *et al.*, 2005; UEKI; MELO; GHIRAN; SPENCER *et al.*, 2013). Em revisão, destacamos que grânulos específicos constituem populações únicas que passam por processamentos diversos, culminando com a formação do grânulo com cristalóide (MELO; WELLER, 2018). No entanto, muitas perguntas permanecem abertas sobre o eosinófilos murinos (WELLER; SPENCER, 2017). Aqui, apresentamos um compreensivo estudo sobre a formação dos grânulos específicos de eosinófilos murinos, evidenciando que durante a maturação da organela, estruturas túbulo-membranosas participam do processo inicial da construção do grânulo.

Em adição, vários processos são envolvidos para a diferenciação terminal do eosinófilo. Citocinas e fatores de crescimento são requeridos em etapas finamente controladas pelo equilíbrio de fatores de transcrição que antecedem a sinalização citoplasmática (O'SULLIVAN; BOCHNER, 2018; WILLEBRAND; VOEHRINGER, 2017). Uma citocina clássica envolvida no desenvolvimento desta célula é a IL-5. Na presença de IL-5 células progenitoras dirigem fenotipicamente para eosinófilo e, por fim, serem direcionadas para o tecido (TAKATSU, 2004; 2011).

Outra citocina importante no processo de desenvolvimento de eosinófilos é o SCF, também conhecido como ligante de *c-kit*. O SCF é considerado uma citocina primária envolvida na hematopoese, diferenciação e ativação de mastócitos e eosinófilos (METCALF; MIFSUD; DI RAGO, 2002; OLIVEIRA; TAUB; NAGEL;

SMITH *et al.*, 2002; WU; LI; MACNEIL; JUNKINS *et al.*, 2013). Em geral, o SCF inicia a sinalização dependente de cálcio mediada pela cascata de calcineurina via retículo endoplasmático, resultando na ativação de fatores de transcrição como o Fator Nuclear de Célula T Ativada (NFAT) e Fator Nuclear kappa B (NF- κ B) (WU; LI; MACNEIL; JUNKINS *et al.*, 2013).

Por sua vez, quando granulócitos são ativados por SCF, estas células são capazes de secretar IL-6 mas não IL-13 (MACNEIL; JUNKINS; WU; LIN, 2014; WANG; MA; TAO; LUO *et al.*, 2019). A secreção de IL-6 pode ser diretamente relacionada com a ativação dos fatores de transcrição NFAT e NF- κ B (KHALAF; JASS; OLSSON, 2013). Em nosso estudo, pela primeira vez mostramos que, eosinófilos murinos obtidos da cultura no 14º dia e estimulados com SCF são capazes de secretar quantidades expressivas de IL-6, como apresentado na Figura 12. Recentemente, trabalhos tem evidenciado o papel de IL-6 na expansão de células hematopoiéticas participando de uma resposta do tipo *Notch* (TIE; LI; CAI; LIANG *et al.*, 2019).

Além da participação de NFAT e NF- κ B na sinalização mediada por influxo de cálcio, XBP1 é mais um fator de transcrição ligado à mesma via, porém depende do estresse causado no RE para exercer suas atividades. Este fator de transcrição foi mostrado a ser importante para a formação dos grânulos específicos em eosinófilos murinos (BETTIGOLE; LIS; ADORO; LEE *et al.*, 2015). O estudo realizado em camundongos *knock-out* verificou que, além de eosinófilos não possuírem a forma madura dos grânulos, as células sofriam alta taxa de apoptose, sugerindo que XBP1 é um fator de transcrição exigido como ‘*check point*’ para maturação de eosinófilos (BETTIGOLE; GLIMCHER, 2016; BETTIGOLE; LIS; ADORO; LEE *et al.*, 2015).

Neste trabalho, a suplementação de SCF desde o início da diferenciação de BMEos acelerou a maturação de grânulos secretores, gerando o dobro de eosinófilos maduros comparado a uma cultura convencional. Estes resultados sugerem que a formação dos grânulos secretores depende de SCF e IL-5 para promover maior formação de grânulos com cristalóide. No entanto, observamos que as cisternas RER eram mais dilatadas comparadas com células se manutenção de citocinas no contexto *in vitro* (Figura 12), indicando que a sinalização por cálcio ativada por SCF pode trazer estresse para o RER, mas isso resulta em maiores quantidades de grânulos competentes a secretarem. A presença de cristalóide denota a presença de MBP funcionalmente ativa.

Em relatos anteriores, SCF apresentava-se como uma citocina promissora no tratamento de várias desordens clínicas, incluindo os procedimentos pré-transplante de medula óssea. Dada seu potencial clínico, SCF era administrado antes da coleta de medula óssea de paciente em tratamento oncológico (BASSER; TO; BEGLEY; MAHER *et al.*, 1998). Esta manobra médica tinha objetivo de aumentar a proliferação de progenitores (BEARMAN, 1997), no entanto, testes pré-clínicos demonstraram que a administração de SCF em paciente em tratamento de câncer de mama, apresentaram sinais de inflamação e hiper-pigmentação local (COSTA; DEMETRI; HARRIST; DVORAK *et al.*, 1996). Os sítios de administração de SCF eram vistos tendo características clássicas de inflamação, as biópsias coletadas do local de administração subcutânea de diferentes pacientes revelaram um grande influxo de mastócitos sofrendo perdas de conteúdos associados com a desgranulação *piecemeal* (DVORAK, A. M.; COSTA, J. J.; MONAHAN-EARLEY, R. A.; FOX, P. *et al.*, 1998). Além de encontrarem uma expressiva quantidade de mastócitos neste tecido, este número foi acompanhado pela presença de eosinófilos em alguns pacientes.

Dependendo da dose, os eosinófilos ativados por SCF desgranulam e liberam peroxidase e leucontriênio C4 em condições *in vitro*. Também, essas células são capazes de secretar outras proteínas estocadas nos grânulos, tal como, quimiocinas CC, RANTES, *macrophage derived chemokine* (MDC), *macrophage inflammatory protein-1* (MIP-1) mas pouco se sabe quais os mecanismos envolvidos nessa secreção (OLIVEIRA; LUKACS, 2003). Aqui, eosinófilos humanos estimulados diretamente com SCF foram capazes de secretar proteína catiônica ECP através da mecanismos de PMD. A formação de vesículas EoSVs foi um aspectos evidente na estimulação com a citocina, sugerindo que a liberação de ECP pode envolver o transporte de vesículas. Um outro ponto identificado em nossas avaliações é o brotamento dessas EoSVs por grânulos específicos livres no sítio inflamatório. Até então, só era conhecida a associação de EoSVs com o transporte intracelular de produtos armazenados nos grânulos. Os dados do presente trabalho indicam que, mesmo livre no espaço extracelular, grânulos específicos parecem aptos a secretarem e liberar EoSVs, conforme demonstrado intracelularmente em resposta à ativação celular (MELO *et al.*, 2005).

Além da PMD, o segundo mecanismo de secreção mais documentado é a citólise. Hoje, existe interesse crescente a respeito de quais são os efeitos dos

componentes citoplasmáticos de eosinófilos citolíticos (UEKI; TOKUNAGA; FUJIEDA; HONDA *et al.*, 2016). Este mecanismo pode ser induzido experimentalmente *in vivo* pelo uso de estímulos alérgicos (AHLSTROM-EMANUELSSON; GREIFF; ANDERSSON; PERSSON *et al.*, 2004; PERSSON; UEKI, 2018) ou ainda *in vitro* (MUNIZ; SILVA; BRAGA; MELO *et al.*, 2018; UEKI; MELO; GHIRAN; SPENCER *et al.*, 2013). Em estudo anterior, notou-se a presença de vesículas, semelhantes a EoSVs, depositadas juntamente com grânulos específicos em biópsias de esofagite eosinofílica, mas pouca atenção foi dada a essa observação (SAFFARI; HOFFMAN; PETERSON; FANG *et al.*, 2014). Aqui, trazemos pela primeira vez que os grânulos específicos encontrados em tecidos inflamatórios são capazes de liberar EoSVs fora do citoplasma.

Considerando nossos dados em eosinófilos murinos, durante a formação dos grânulos, especificamente em grânulos em condensação, é visto uma organização interna de túbulos membranosos conferindo um tráfico de membrana intragranular. Isso sugere que esse mesmo tráfico de membranas pode participar da formação de EoSVs em grânulos livres no tecido inflamatório. Estudos do nosso grupo demonstraram que a mobilização de MBP (Melo e cols., 2009) e citocinas, como IL-4, em eosinófilos humanos (Bandeira-Melo e cols., 2001), são realizadas por meio do tráfico de EoSVs a partir de grânulos secretores. Estímulos como CCL11 ou CCL5 em eosinófilos humanos rapidamente liberam IL-4 a partir da ligação com seu receptor intracelular IL-4R α , um processo no qual não há a iniciação de uma cascata de sinalização mediada por IL-4R (Spencer e cols., 2006). Além disso, foi demonstrado que eosinófilos possuem uma quantidade substancial de outros receptores de citocinas associados a grânulos e vesículas, como os receptores IL-6R α e IL-13R α 1.

Recentemente, nós demonstramos que EoSVs e grânulos secretores também se mostram marcados para o IFN- γ , quando estudamos a localização subcelular e tráfego desta molécula em eosinófilos estimulados ou não com mediadores inflamatórios (CCL11 e TNF- α) (CARMO; BONJOUR; SPENCER; WELLER *et al.*, 2018). O IFN- γ foi encontrado em altos níveis em eosinófilos humanos e pode ser secretado por essas células em resposta a diferentes estímulos (SPENCER, L. A.; BONJOUR, K.; MELO, R. C. N.; WELLER, P. F., 2014), desta forma confirmando que o IFN- γ é armazenado pré-formado em grânulos específicos em eosinófilos humanos.

Outro ponto abordado neste trabalho foi a presença de mitocôndrias durante

o desenvolvimento e ativação do eosinófilo. Em células-tronco hematopoiéticas, as mitocôndrias promovem a respiração celular e são requeridas para a manutenção ao longo do amadurecimento celular (BONORA; PINTON; ITO, 2015). No entanto, as mitocôndrias dos eosinófilos humanos fornecer pouco suporte para respiração mas participam significativamente da apoptose (PEACHMAN; LYLES; BASS, 2001; PORTER; TOEPFNER; BASHANT; GUCK *et al.*, 2018).

A presença e função de mitocôndrias em eosinófilos murinos são pouco conhecidas. Em nosso estudo, notamos que a população de mitocôndrias diminui mediante a maturação dos eosinófilos, sugerindo que estas organelas podem auxiliar os processos de desenvolvimento dos eosinófilos. Enquanto as mitocôndrias diminuam sua população em eosinófilos maduros, a população remanescente do processo de maturação mostrou-se capaz de sofrer alterações morfológicas quando as células eram estimuladas por CCL11 e TNF- α . Essas alterações na forma mitocondrial podem refletir um inchaço mitocondrial com perda de cristais em resposta à ativação *in vitro*. A identificação de moléculas e mecanismos a respeito da fusão e fissão mitocondrial marcaram os progressos no entendimento sobre biologia celular das mitocôndrias (BANOTH; CASSEL, 2018; CANTO, 2018; SEO; YOON; DO, 2018).

Vale destacar que, algumas mitocôndrias observadas durante o desenvolvimento de eosinófilos murinos apresentaram brotamento de vesículas a partir da membrana externa, como identificado por tomografia eletrônica (Figura 17). Em estudos evidenciando a dinâmica mitocondrial, estas vesículas foram primeiramente encontradas transportando proteína da membrana externa da mitocôndria (MAPL) para uma subpopulação de peroxissomos ou para corpos multivesiculares. Além disso, foi descrito que a proteína Vps35 associada com a doença de Parkinson, Parkina, e PINK1 são envolvidas na biogênese deste grupo de vesículas, o que relaciona a participação desta vesícula no controle de qualidade celular encontrado em desordens patológicas (SUGIURA; MCLELLAND; FON; MCBRIDE, 2014). Isso indica que as mitocôndrias além de participarem do processo de desenvolvimento de eosinófilos, podem desempenhar papéis importante para a manutenção desse amadurecimento.

5 CONCLUSÕES

Aqui, apresentamos evidências que a utilização de citocinas relacionadas com a sinalização dependente de cálcio, podem aumentar o número de células contendo grânulos específicos mais aptos a secretarem. Com a padronização da granulogênese e a implementação de SCF em toda a cultura, este estudo permite avançar em novos achados para entender como as proteínas inflamatórias são endereçadas aos grânulos e, por conseguinte, como são liberadas em situações patológicas.

Em conjunto, os dados do presente trabalho demonstram que os grânulos específicos de eosinófilos murinos são organelas altamente dinâmicas e estruturalmente complexas contendo membranas intragranulares e não apenas contêineres de armazenamento de produtos. Durante a diferenciação de eosinófilos murinos, os grânulos específicos sofrem processos de condensação e cristalização, os quais levam à forma madura da célula, caracterizada pela presença de grânulos com cristalóide. Os grânulos específicos de eosinófilos murinos são organelas com capacidade de compartimentalizar seus conteúdos durante toda a sua formação e aptos a liberá-los de forma coordenada quando são requeridos no processo inflamatório, em resposta à estímulos.

Sob efeito de SCF, eosinófilos murinos e humanos são ativados e aptos a secretarem. Os processos de secreção de eosinófilos humanos envolvem PMD e citólise. A liberação de EoSVs a partir de grânulos livres no meio extracelular abre novas perspectivas para o entendimento do papel dessas células na imunomodulação de processos alérgicos e infecciosos.

Nossos dados demonstram que a população de mitocôndrias de eosinófilos de camundongos é consistentemente reduzida durante a maturação dos eosinófilos e que alterações morfológicas mitocondriais ocorrem em resposta à ativação celular, sendo mais evidentes do que alterações na quantidade dessas organelas. Mitocôndrias das células ativadas capacidade liberam vesículas de suas membranas externas e sofrem remodelação das cristas mitocondriais, conforme detectado por análises em 3D por tomografia eletrônica. Assim, as mitocôndrias de eosinófilos mostram variabilidade ultraestrutural e são capazes de se modular junto com o desenvolvimento e ativação celular.

6 REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil granule proteins: form and function. **J Biol Chem**, 289, n. 25, p. 17406-17415, Jun 20 2014.
- ACKERMAN, S. J. **To be, or not to be, an eosinophil: that is the ???** 2013-08-01 00:00:00 2013. 621-623 p., v. 5). Journal Article.
- AHLSTROM-EMANUELSSON, C.; GREIFF, L.; ANDERSSON, M.; PERSSON, C. *et al.* Eosinophil degranulation status in allergic rhinitis: observations before and during seasonal allergen exposure. 24, n. 5, p. 750-757, 2004.
- AKASHI, K.; TRAVER, D.; MIYAMOTO, T.; WEISSMAN, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. **Nature**, 404, n. 6774, p. 193-197, 03/09/print 2000. 10.1038/35004599.
- AKUTHOTA, P.; CARMO, L. A.; BONJOUR, K.; MURPHY, R. O. *et al.* Extracellular Microvesicle Production by Human Eosinophils Activated by "Inflammatory" Stimuli. **Front Cell Dev Biol**, 4, p. 117, 2016.
- BANOTH, B.; CASSEL, S. L. Mitochondria in innate immune signaling. **Transl Res**, 202, p. 52-68, Dec 2018.
- BARKER, R. L.; GLEICH, G. J.; PEASE, L. R. Acidic precursor revealed in human eosinophil granule major basic protein cDNA. **J Exp Med**, 168, n. 4, p. 1493-1498, Oct 1 1988.
- BASSER, R. L.; TO, L. B.; BEGLEY, C. G.; MAHER, D. *et al.* Rapid hematopoietic recovery after multicycle high-dose chemotherapy: enhancement of filgrastim-induced progenitor-cell mobilization by recombinant human stem-cell factor. **Journal of clinical oncology**, 16, n. 5, p. 1899-1908, 1998.
- BEARMAN, S. I. Use of stem cell factor to mobilize hematopoietic progenitors. **Current opinion in hematology**, 4, n. 3, p. 157-162, 1997.
- BEIL, W. J.; WELLER, P. F.; TZIZIK, D. M.; GALLI, S. J. *et al.* Ultrastructural immunogold localization of tumor necrosis factor-alpha to the matrix compartment of eosinophil secondary granules in patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome. **J Histochem Cytochem**, 41, n. 11, p. 1611-1615, Nov 1993. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- BETTIGOLE, S. E.; GLIMCHER, L. H. Novel roles for XBP1 in hematopoietic development. **Cell Cycle**, 15, n. 13, p. 1653-1654, 07 2016.
- BETTIGOLE, S. E.; LIS, R.; ADORO, S.; LEE, A. H. *et al.* The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation. **Nat Immunol**, 16, n. 8, p. 829-837, Aug 2015.
- BLANCHARD, C.; ROTHENBERG, M. E. Biology of the eosinophil. **Adv Immunol**, 101, p. 81-121, 2009. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.
- BLANCHET, M. R.; MALTBY, S.; HADDON, D. J.; MERKENS, H. *et al.* CD34 facilitates the development of allergic asthma. **Blood**, 110, n. 6, p. 2005-2012, Sep 15 2007. Research Support, Non-U.S. Gov't.

- BLANCHET, M. R.; MCNAGNY, K. M. Stem cells, inflammation and allergy. **Allergy Asthma Clin Immunol**, 5, n. 1, p. 13, Dec 2009.
- BOIX, E.; SALAZAR, V. A.; TORRENT, M.; PULIDO, D. *et al.* Structural determinants of the eosinophil cationic protein antimicrobial activity. **Biol Chem**, 393, n. 8, p. 801-815, Aug 2012. Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.
- BONJOUR, K. **Mecanismo de Secreção de Eosinófilos Murinos em Respostas a estímulos Inflamatórios e a Asma Experimental**. 2015. 102 f. (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- BONORA, M.; PINTON, P.; ITO, K. Mitochondrial control of hematopoietic stem cell balance and hematopoiesis. **Frontiers in Biology**, 10, n. 2, p. 117-124, 2015.
- BYSTROM, J.; AMIN, K.; BISHOP-BAILEY, D. Analysing the eosinophil cationic protein - a clue to the function of the eosinophil granulocyte. **Respiratory Research**, 12, n. 1, p. 10, 2011.
- CANTO, C. Mitochondrial Dynamics: Shaping Metabolic Adaptation. **Int Rev Cell Mol Biol**, 340, p. 129-167, 2018.
- CARMO, L. A. S.; BONJOUR, K.; SPENCER, L. A.; WELLER, P. F. *et al.* Single-Cell Analyses of Human Eosinophils at High Resolution to Understand Compartmentalization and Vesicular Trafficking of Interferon-Gamma. **Front Immunol**, 9, p. 1542, 2018.
- Chapter 5 - Eosinophilopoiesis. *In*: ROSENBERG, J. J. L. F. (Ed.). **Eosinophils in Health and Disease**. Boston: Academic Press, 2013. p. 73-119.
- COSTA, J. J.; DEMETRI, G. D.; HARRIST, T.; DVORAK, A. M. *et al.* Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, 183, n. 6, p. 2681-2686, 1996.
- CRIVELLATO, E.; NICO, B.; MALLARDI, F.; BELTRAMI, C. A. *et al.* Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, 274, n. 1, p. 778-784, 2003.
- DAVOINE, F.; LACY, P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. **Front Immunol**, 5, p. 570, 2014. Review.
- DENZLER, K. L.; BORCHERS, M. T.; CROSBY, J. R.; CIESLEWICZ, G. *et al.* Extensive eosinophil degranulation and peroxidase-mediated oxidation of airway proteins do not occur in a mouse ovalbumin-challenge model of pulmonary inflammation. **J Immunol**, 167, n. 3, p. 1672-1682, Aug 1 2001. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- DENZLER, K. L.; FARMER, S. C.; CROSBY, J. R.; BORCHERS, M. *et al.* Eosinophil major basic protein-1 does not contribute to allergen-induced airway pathologies in mouse models of asthma. **J Immunol**, 165, n. 10, p. 5509-5517, Nov 15 2000. Comparative Study
Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- DESREUMAUX, P.; JANIN, A.; COLOMBEL, J. F.; PRIN, L. *et al.* Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. **J Exp Med**, 175, n. 1, p. 293-296, Jan 1 1992. Research Support, Non-U.S. Gov't.
- DIAS, F. F.; AMARAL, K. B.; MALTA, K. K.; SILVA, T. P. *et al.* Identification of Piecemeal Degranulation and Vesicular Transport of MBP-1 in Liver-Infiltrating Mouse Eosinophils During Acute Experimental. **Front Immunol**, 9, p. 3019, 2018.

DOMACHOWSKE, J. B.; DYER, K. D.; ADAMS, A. G.; LETO, T. L. *et al.* Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. **Nucleic Acids Research**, 26, n. 14, p. 3358-3363, 1998.

DOMACHOWSKE, J. B.; DYER, K. D.; ADAMS, A. G.; LETO, T. L. *et al.* Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. **Nucleic Acids Res**, 26, n. 14, p. 3358-3363, Jul 15 1998. Research Support, Non-U.S. Gov't.

DORN, I.; LAZAR-KARSTEN, P.; BOIE, S.; RIBBAT, J. *et al.* In vitro proliferation and differentiation of human CD34+ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems. **Transfusion**, 48, n. 6, p. 1122-1132, Jun 2008.

DURACK, D. T.; ACKERMAN, S. J.; LOEGERING, D. A.; GLEICH, G. J. Purification of human eosinophil-derived neurotoxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 78, n. 8, p. 5165-5169, Aug 1981. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

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

DVORAK, A. M.; COSTA, J. J.; MONAHAN-EARLEY, R. A.; FOX, P. *et al.* Ultrastructural analysis of human skin biopsy specimens from patients receiving recombinant human stem cell factor: subcutaneous injection of rhSCF induces dermal mast cell degranulation and granulocyte recruitment at the injection site. **Journal of allergy and clinical immunology**, 101, n. 6, p. 793-806, 1998.

DVORAK, A. M.; COSTA, J. J.; MONAHAN-EARLEY, R. A.; FOX, P. *et al.* Ultrastructural analysis of human skin biopsy specimens from patients receiving recombinant human stem cell factor: subcutaneous injection of rhSCF induces dermal mast cell degranulation and granulocyte recruitment at the injection site. **J Allergy Clin Immunol**, 101, n. 6 Pt 1, p. 793-806, Jun 1998. Clinical Trial
Clinical Trial, Phase I
Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

DVORAK, A. M.; DICKERSIN, G. R.; CONNELL, A.; CAREY, R. W. *et al.* Degranulation mechanisms in human leukemic basophils. **Clin Immunol Immunopathol**, 5, n. 2, p. 235-246, Mar 1976. Case Reports
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

DVORAK, A. M.; ISHIZAKA, T. Human eosinophils in vitro. An ultrastructural morphology primer. **Histol Histopathol**, 9, n. 2, p. 339-374, Apr 1994.

DYER, K. D.; MOSER, J. M.; CZAPIGA, M.; SIEGEL, S. J. *et al.* Functionally competent eosinophils differentiated ex vivo in high purity from normal mouse bone marrow. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 181, n. 6, p. 4004-4009, 2008a.

DYER, K. D.; MOSER, J. M.; CZAPIGA, M.; SIEGEL, S. J. *et al.* Functionally competent eosinophils differentiated ex vivo in high purity from normal mouse bone marrow. **J Immunol**, 181, n. 6, p. 4004-4009, Sep 2008.

DYER, K. D.; MOSER, J. M.; CZAPIGA, M.; SIEGEL, S. J. *et al.* Functionally competent eosinophils differentiated ex vivo in high purity from normal mouse bone marrow. **The Journal of Immunology**, 181, n. 6, p. 4004-4009, 2008b.

DYER, K. D.; PERCOPO, C. M.; ROSENBERG, H. F. IL-33 promotes eosinophilia in vivo and antagonizes IL-5-dependent eosinophil hematopoiesis ex vivo. **Immunol Lett**, 150, n. 1-2, p. 41-47, Feb 2013.

EGESTEN, A.; CALAFAT, J.; KNOL, E. F.; JANSSEN, H. *et al.* Subcellular localization of transforming growth factor-alpha in human eosinophil granulocytes. **Blood**, 87, n. 9, p. 3910-3918, May 1 1996. Research Support, Non-U.S. Gov't.

EGESTEN, A.; CALAFAT, J.; WELLER, P. F.; KNOL, E. F. *et al.* Localization of granule proteins in human eosinophil bone marrow progenitors. **Int Arch Allergy Immunol**, 114, n. 2, p. 130-138, Oct 1997.

ELSNER, J.; HOCHSTETTER, R.; KIMMIG, D.; KAPP, A. Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils. **Eur J Immunol**, 26, n. 8, p. 1919-1925, Aug 1996. Research Support, Non-U.S. Gov't.

FONSECA, W.; RASKY, A. J.; PTASCHINSKI, C.; MORRIS, S. H. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells (ILC2) are regulated by stem cell factor during chronic asthmatic disease. **Mucosal Immunol**, 12, n. 2, p. 445-456, Mar 2019.

FULKERSON, P. C.; ROTHENBERG, M. E. Eosinophil Development, Disease Involvement, and Therapeutic Suppression. **Adv Immunol**, 138, p. 1-34, 2018.

GLEICH, G. J.; ADOLPHSON, C. R.; LEIFERMAN, K. M. The biology of the eosinophilic leukocyte. **Annual review of medicine**, 44, n. 1, p. 85-101, 1993.

GLEICH, G. J.; LOEGERING, D. A.; BELL, M. P.; CHECKEL, J. L. *et al.* Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 83, n. 10, p. 3146-3150, May 1986. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

GLEICH, G. J.; LOEGERING, D. A.; MALDONADO, J. E. Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules. **J Exp Med**, 137, n. 6, p. 1459-1471, Jun 1 1973.

GORDON, M. H. Remarks on HODGKIN'S DISEASE: A PATHOGENIC AGENT IN THE GLANDS, AND ITS APPLICATION IN DIAGNOSIS. **British Medical Journal**, 1, n. 3771, p. 641-644, 1933.

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

HAMID, Q.; BARKANS, J.; MENG, Q.; YING, S. *et al.* Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, in vitro. **Blood**, 80, n. 6, p. 1496-1501, Sep 15 1992. Research Support, Non-U.S. Gov't.

HARTMANN, J.; SCEPEK, S.; LINDAU, M. Regulation of granule size in human and horse eosinophils by number of fusion events among unit granules. **The Journal of Physiology**, 483, n. Pt 1, p. 201-209, 1995.

HEIDEMANN, S. M.; FIORE, M.; SOOD, S.; HAM, S. Eosinophil activation in the cerebrospinal fluid of children with shunt obstruction. **Pediatr Neurosurg**, 46, n. 4, p. 255-258, 2010.

HENDERSON, W. R.; CHI, E. Y. Ultrastructural characterization and morphometric analysis of human eosinophil degranulation. **J Cell Sci**, 73, p. 33-48, Feb 1985. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

HENDERSON, W. R.; CHI, E. Y.; JORG, A.; KLEBANOFF, S. J. Horse eosinophil degranulation induced by the ionophore A23187. Ultrastructure and role of phospholipase A2. **Am J Pathol**, 111, n. 3, p. 341-349, Jun 1983. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

HENDERSON, W. R.; JÖRG, A.; KLEBANOFF, S. J. Eosinophil peroxidase-mediated inactivation of leukotrienes B4, C4, and D4. **The Journal of Immunology**, 128, n. 6, p. 2609-2613, 1982.

HOFER, M.; VACEK, A.; POSPISIL, M.; WEITEROVA, L. *et al.* Adenosine potentiates stimulatory effects on granulocyte-macrophage hematopoietic progenitor cells in vitro of IL-3 and SCF, but not those of G-CSF, GM-CSF and IL-11. **Physiol Res**, 55, n. 5, p. 591-596, 2006.

HOGAN, S. P.; ROSENBERG, H. F.; MOQBEL, R.; PHIPPS, S. *et al.* Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin Exp Allergy**, 38, n. 5, p. 709-750, May 2008. Editorial Review.

INOUE, Y.; MATSUWAKI, Y.; SHIN, S.-H.; PONIKAU, J. U. *et al.* Nonpathogenic, environmental fungi induce activation and degranulation of human eosinophils. **The Journal of Immunology**, 175, n. 8, p. 5439-5447, 2005.

JONSSON, U. B.; BLOM, K.; STALENHEIM, G.; HAKANSSON, L. D. *et al.* The production of the eosinophil proteins ECP and EPX/EDN are regulated in a reciprocal manner. **APMIS**, 122, n. 4, p. 283-291, Apr 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't.

JUNG, J. W.; KANG, H. R.; LEE, H. S.; PARK, H. W. *et al.* Expression levels of eosinophil granule protein mRNAs in induced sputum reflect airway hyperresponsiveness and airflow limitation. **Tohoku J Exp Med**, 233, n. 1, p. 49-56, 2014.

KHALAF, H.; JASS, J.; OLSSON, P. E. The role of calcium, NF-kappaB and NFAT in the regulation of CXCL8 and IL-6 expression in Jurkat T-cells. **Int J Biochem Mol Biol**, 4, n. 3, p. 150-156, 2013.

KOURO, T.; TAKATSU, K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. **Int Immunol**, 21, n. 12, p. 1303-1309, Dec 2009. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

LACY, P.; MAHMUDI-AZER, S.; BABLITZ, B.; HAGEN, S. C. *et al.* Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils. **Blood**, 94, n. 1, p. 23-32, Jul 1 1999. Research Support, Non-U.S. Gov't.

LACY, P.; MOQBEL, R. Eosinophil cytokines. **Chem Immunol**, 76, p. 134-155, 2000. Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

LACY, P.; ROSENBERG, H. F.; WALSH, G. M. Eosinophil overview: structure, biological properties, and key functions. **Methods Mol Biol**, 1178, p. 1-12, 2014.

LEE, J. J.; JACOBSEN, E. A.; OCHKUR, S. I.; MCGARRY, M. P. *et al.* Human versus mouse eosinophils: "that which we call an eosinophil, by any other name would stain as red". **J Allergy Clin Immunol**, 130, n. 3, p. 572-584, Sep 2012.

LEVI-SCHAFFER, F.; BARKANS, J.; NEWMAN, T. M.; YING, S. *et al.* Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. **Immunology**, 87, n. 1, p. 155-161, Jan 1996. Research Support, Non-U.S. Gov't.

LEVI-SCHAFFER, F.; LACY, P.; SEVERS, N. J.; NEWMAN, T. M. *et al.* Association of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with the crystalloid granules of human eosinophils. **Blood**, 85, n. 9, p. 2579-2586, May 1 1995. Research Support, Non-U.S. Gov't.

LOCKSLEY, R. M.; WILSON, C. B.; KLEBANOFF, S. J. Role for endogenous and acquired peroxidase in the toxoplasmicidal activity of murine and human mononuclear phagocytes. **Journal of Clinical Investigation**, 69, n. 5, p. 1099, 1982.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P. *et al.* Overview of the Secretory Pathway. 2000 2000. Text.

LOGAN, M. R.; LACY, P.; BABLITZ, B.; MOQBEL, R. Expression of eosinophil target SNAREs as

potential cognate receptors for vesicle-associated membrane protein-2 in exocytosis. **J Allergy Clin Immunol**, 109, n. 2, p. 299-306, Feb 2002. Research Support, Non-U.S. Gov't.

LYMAN, S. D.; JACOBSEN, S. E. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. **Blood**, 91, n. 4, p. 1101-1134, Feb 15 1998.

MACIAS, M. P.; WELCH, K. C.; DENZLER, K. L.; LARSON, K. A. *et al.* Identification of a new murine eosinophil major basic protein (mMBP) gene: cloning and characterization of mMBP-2. **J Leukoc Biol**, 67, n. 4, p. 567-576, Apr 2000. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

MACK, E. A.; STEIN, S. J.; ROME, K. S.; XU, L. *et al.* Trib1 regulates eosinophil lineage commitment and identity by restraining the neutrophil program. **Blood**, 133, n. 22, p. 2413-2426, May 2019.

MACNEIL, A. J.; JUNKINS, R. D.; WU, Z.; LIN, T. J. Stem cell factor induces AP-1-dependent mast cell IL-6 production via MAPK kinase 3 activity. **J Leukoc Biol**, 95, n. 6, p. 903-915, Jun 2014.

MALTBY, S.; WOHLFARTH, C.; GOLD, M.; ZBYTNUIK, L. *et al.* CD34 Is Required for Infiltration of Eosinophils into the Colon and Pathology Associated with DSS-Induced Ulcerative Colitis. **The American Journal of Pathology**, 177, n. 3, p. 1244-1254, 05/20/accepted 2010.

MASTRONARDE, D. N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. **J Struct Biol**, 152, n. 1, p. 36-51, Oct 2005.

MASTRONARDE, D. N.; HELD, S. R. Automated tilt series alignment and tomographic reconstruction in IMOD. **J Struct Biol**, 197, n. 2, p. 102-113, 02 2017.

MATTHEWS, S. P.; MCMILLAN, S. J.; COLBERT, J. D.; LAWRENCE, R. A. *et al.* Cystatin F Ensures Eosinophil Survival by Regulating Granule Biogenesis. **Immunity**, 44, n. 4, p. 795-806, Apr 2016.

MCLAREN, D. J.; MACKENZIE, C. D.; RAMALHO-PINTO, F. J. Ultrastructural observations on the in vitro interaction between rat eosinophils and some parasitic helminths (*Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis* and *Nippostrongylus brasiliensis*). **Clinical and Experimental Immunology**, 30, n. 1, p. 105-118, 1977.

MELO, R. C.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Contributions of electron microscopy to understand secretion of immune mediators by human eosinophils. **Microsc Microanal**, 16, n. 6, p. 653-660, Dec 2010.

MELO, R. C.; LIU, L.; XENAKIS, J. J.; SPENCER, L. A. Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. **Allergy**, 68, n. 3, p. 274-284, Mar 2013.
Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

MELO, R. C.; PEREZ, S. A.; SPENCER, L. A.; DVORAK, A. M. *et al.* Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. **Traffic**, 6, n. 10, p. 866-879, 2005.

MELO, R. C.; PEREZ, S. A.; SPENCER, L. A.; DVORAK, A. M. *et al.* Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. **Traffic**, 6, n. 10, p. 866-879, Oct 2005.

MELO, R. C.; SPENCER, L. A.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F. Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. **J Leukoc Biol**, 83, n. 2, p. 229-236, Feb 2008. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't

Review.

MELO, R. C.; SPENCER, L. A.; PEREZ, S. A.; GHIRAN, I. *et al.* Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. **Traffic**, 6, n. 11, p. 1047-1057, Nov 2005. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

MELO, R. C.; WELLER, P. F. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. **Histol Histopathol**, 25, n. 10, p. 1341-1354, Oct 2010. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't
Review.

MELO, R. C. N.; SPENCER, L. A.; PEREZ, S. A. C.; GHIRAN, I. *et al.* Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 (IL-4) through distinct vesicular compartments. **Traffic**, 6, n. 11, p. 1047-1057, 2005.

MELO, R. C. N.; WELLER, P. F. Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. **J Leukoc Biol**, 104, n. 1, p. 85-93, 07 2018.

METCALF, D.; MIFSUD, S.; DI RAGO, L. Stem cell factor can stimulate the formation of eosinophils by two types of murine eosinophil progenitor cells. **Stem Cells**, 20, n. 5, p. 460-469, 2002.

MOLLER, G. M.; DE JONG, T. A.; OVERBEEK, S. E.; VAN DER KWAST, T. H. *et al.* Ultrastructural immunogold localization of interleukin 5 to the crystalloid core compartment of eosinophil secondary granules in patients with atopic asthma. **J Histochem Cytochem**, 44, n. 1, p. 67-69, Jan 1996. Research Support, Non-U.S. Gov't.

MOLLER, G. M.; DE JONG, T. A.; VAN DER KWAST, T. H.; OVERBEEK, S. E. *et al.* Immunolocalization of interleukin-4 in eosinophils in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 14, n. 5, p. 439-443, May 1996. Comparative Study
Research Support, Non-U.S. Gov't.

MOQBEL, R.; YING, S.; BARKANS, J.; NEWMAN, T. M. *et al.* Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. **J Immunol**, 155, n. 10, p. 4939-4947, Nov 15 1995. Research Support, Non-U.S. Gov't.

MUNIZ, V. S.; SILVA, J. C.; BRAGA, Y. A. V.; MELO, R. C. N. *et al.* Eosinophils release extracellular DNA traps in response to *Aspergillus fumigatus*. **J Allergy Clin Immunol**, 141, n. 2, p. 571-585.e577, 02 2018.

NAKAJIMA, T.; YAMADA, H.; IIKURA, M.; MIYAMASU, M. *et al.* Intracellular localization and release of eotaxin from normal eosinophils. **FEBS Lett**, 434, n. 3, p. 226-230, Sep 4 1998.

NEWTON, D. L.; NICHOLLS, P. J.; RYBAK, S. M.; YOULE, R. J. Expression and characterization of recombinant human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil-derived neurotoxin-anti-transferrin receptor sFv. **Journal of Biological Chemistry**, 269, n. 43, p. 26739-26745, 1994.

O'SULLIVAN, J. A.; BOCHNER, B. S. Eosinophils and eosinophil-associated diseases: An update. **J Allergy Clin Immunol**, 141, n. 2, p. 505-517, Feb 2018.

OCHKUR, S. I.; DOYLE, A. D.; JACOBSEN, E. A.; LESUER, W. E. *et al.* Frontline Science: Eosinophil-deficient MBP-1 and EPX double-knockout mice link pulmonary remodeling and airway dysfunction with type 2 inflammation. **J Leukoc Biol**, 102, n. 3, p. 589-599, 09 2017.

OLIVEIRA, S. H.; LUKACS, N. W. Stem cell factor: a hemopoietic cytokine with important targets in asthma. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, 2, n. 4, p. 313-318, Dec 2003.

- OLIVEIRA, S. H.; TAUB, D. D.; NAGEL, J.; SMITH, R. *et al.* Stem cell factor induces eosinophil activation and degranulation: mediator release and gene array analysis. **Blood**, 100, n. 13, p. 4291-4297, Dec 15 2002. Comparative Study
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- PARK, M. K.; MYERS, R. A. M.; MARZELLA, L. Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. **Clinical infectious diseases**, 14, n. 3, p. 720-740, 1992.
- PARK, S. Y.; OH, S.; KIM, E. J.; YOON, S. Y. *et al.* Utility of eosinophil cationic protein levels in the diagnosis of intrinsic atopic dermatitis. **Acta Derm Venereol**, 94, n. 3, p. 333-334, May 2014.
- PEACHMAN, K. K.; LYLES, D. S.; BASS, D. A. Mitochondria in eosinophils: functional role in apoptosis but not respiration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 98, n. 4, p. 1717-1722, 2001.
- PERSSON, C.; UEKI, S. Lytic eosinophils produce extracellular DNA traps as well as free eosinophil granules. **J Allergy Clin Immunol**, 141, n. 3, p. 1164, Mar 2018.
- PLAGER, D. A.; DAVIS, M. D.; ANDREWS, A. G.; COENEN, M. J. *et al.* Eosinophil ribonucleases and their cutaneous lesion-forming activity. **J Immunol**, 183, n. 6, p. 4013-4020, Sep 15 2009. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't.
- PLAGER, D. A.; LOEGERING, D. A.; WEILER, D. A.; CHECKEL, J. L. *et al.* A novel and highly divergent homolog of human eosinophil granule major basic protein. **J Biol Chem**, 274, n. 20, p. 14464-14473, May 14 1999. Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- PLAGER, D. A.; STUART, S.; GLEICH, G. J. Human eosinophil granule major basic protein and its novel homolog. **Allergy**, 53, n. 45 Suppl, p. 33-40, 1998. Review.
- POPKEN-HARRIS, P.; CHECKEL, J.; LOEGERING, D.; MADDEN, B. *et al.* Regulation and processing of a precursor form of eosinophil granule major basic protein (ProMBP) in differentiating eosinophils. **Blood**, 92, n. 2, p. 623-631, Jul 15 1998.
- PORTER, L.; TOEPFNER, N.; BASHANT, K. R.; GUCK, J. *et al.* Metabolic Profiling of Human Eosinophils. **Frontiers in Immunology**, 9, n. 1404, 2018-June-21 2018. Original Research.
- PULIDO, D.; TORRENT, M.; ANDREU, D.; NOGUES, M. V. *et al.* Two human host defense ribonucleases against mycobacteria, the eosinophil cationic protein (RNase 3) and RNase 7. **Antimicrob Agents Chemother**, 57, n. 8, p. 3797-3805, Aug 2013. Research Support, Non-U.S. Gov't.
- RAMAROKOTO, C. E.; KILDEMOES, A. O.; RANDRIANASOLO, B. S.; RAVONIARIMBININA, P. *et al.* Eosinophil granule proteins ECP and EPX as markers for a potential early-stage inflammatory lesion in female genital schistosomiasis (FGS). **PLoS Negl Trop Dis**, 8, n. 7, p. e2974, Jul 2014. Research Support, Non-U.S. Gov't.
- ROSENBERG, H. F. The eosinophil ribonucleases. **Cell Mol Life Sci**, 54, n. 8, p. 795-803, Aug 1998. Historical Article
Review.
- ROSENBERG, H. F.; DYER, K. D.; FOSTER, P. S. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. **Nat Rev Immunol**, 13, n. 1, p. 9-22, Jan 2013.
- ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annu Rev Immunol**, 24, p. 147-174, 2006. Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
Review.

SAFFARI, H.; HOFFMAN, L. H.; PETERSON, K. A.; FANG, J. C. *et al.* Electron microscopy elucidates eosinophil degranulation patterns in patients with eosinophilic esophagitis. **J Allergy Clin Immunol**, 133, n. 6, p. 1728-1734 e1721, Jun 2014.

SAKABE, H.; KIMURA, T.; ZENG, Z.; MINAMIGUCHI, H. *et al.* Haematopoietic action of flt3 ligand on cord blood-derived CD34-positive cells expressing different levels of flt3 or c-kit tyrosine kinase receptor: comparison with stem cell factor. **Eur J Haematol**, 60, n. 5, p. 297-306, May 1998.

SEO, B. J.; YOON, S. H.; DO, J. T. Mitochondrial Dynamics in Stem Cells and Differentiation. **Int J Mol Sci**, 19, n. 12, Dec 5 2018.

SHALIT, M.; SEKHSARIA, S.; MALECH, H. L. Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34+ cells by IL5 and other growth factors. **Cellular immunology**, 160, n. 1, p. 50-57, 1995.

SHAMRI, R.; MELO, R. C.; YOUNG, K. M.; BIVAS-BENITA, M. *et al.* CCL11 elicits secretion of RNases from mouse eosinophils and their cell-free granules. **FASEB J**, 26, n. 5, p. 2084-2093, May 2012. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't.

SPENCER, L. A.; BONJOUR, K.; MELO, R. C.; WELLER, P. F. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. **Front Immunol**, 5, p. 496, 2014. Review.

SPENCER, L. A.; BONJOUR, K.; MELO, R. C. N.; WELLER, P. F. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. **Frontiers in Immunology**, 5, 2014. 10.3389/fimmu.2014.00496.

SPENCER, L. A.; MELO, R. C.; PEREZ, S. A.; BAFFORD, S. P. *et al.* Cytokine receptor-mediated trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, n. 9, p. 3333-3338, Feb 2006.

SPENCER, L. A.; SZELA, C. T.; PEREZ, S. A.; KIRCHHOFFER, C. L. *et al.* Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. **J Leukoc Biol**, 85, n. 1, p. 117-123, Jan 2009. Research Support, N.I.H., Extramural
Research Support, Non-U.S. Gov't.

SUGIURA, A.; MCLELLAND, G. L.; FON, E. A.; MCBRIDE, H. M. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. **The EMBO journal**, 33, n. 19, p. 2142-2156, 2014.

TAKATSU, K. [Role of interleukin-5 in immune regulation and inflammation]. **Nihon Rinsho**, 62, n. 10, p. 1941-1951, Oct 2004.

TAKATSU, K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, 87, n. 8, p. 463-485, 2011.

TEDESCHI, A.; MARZANO, A. V.; LORINI, M.; BALICE, Y. *et al.* Eosinophil cationic protein levels parallel coagulation activation in the blister fluid of patients with bullous pemphigoid. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, Mar 20 2014.

TENSCHER, K.; METZNER, B.; SCHOPF, E.; NORGAUER, J. *et al.* Recombinant human eotaxin induces oxygen radical production, Ca(2+)-mobilization, actin reorganization, and CD11b upregulation in human eosinophils via a pertussis toxin-sensitive heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein. **Blood**, 88, n. 8, p. 3195-3199, Oct 15 1996. Research Support, Non-U.S. Gov't.

TIE, R.; LI, H.; CAI, S.; LIANG, Z. *et al.* Interleukin-6 signaling regulates hematopoietic stem cell

emergence. **Exp Mol Med**, 51, n. 10, p. 124, Oct 24 2019.

TOPIC, R. Z.; DODIG, S. Eosinophil cationic protein--current concepts and controversies. **Biochem Med (Zagreb)**, 21, n. 2, p. 111-121, 2011. Review.

UEKI, S.; MELO, R. C.; GHIRAN, I.; SPENCER, L. A. *et al.* Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. **Blood**, 121, n. 11, p. 2074-2083, Mar 14 2013.

UEKI, S.; TOKUNAGA, T.; FUJIEDA, S.; HONDA, K. *et al.* Eosinophil ETosis and DNA Traps: a New Look at Eosinophilic Inflammation. **Curr Allergy Asthma Rep**, 16, n. 8, p. 54, 072016.

UHM, T. G.; KIM, B. S.; CHUNG, I. Y. Eosinophil Development, Regulation of Eosinophil-Specific Genes, and Role of Eosinophils in the Pathogenesis of Asthma. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, 4, n. 2, p. 68-79, 11/25

07/30/received

08/31/accepted 2012.

URBAN, J. F.; NOBEN-TRAUTH, N.; DONALDSON, D. D.; MADDEN, K. B. *et al.* IL-13, IL-4R α , and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. **Immunity**, 8, n. 2, p. 255-264, 1998.

WANG, Y.; MA, H.; TAO, X.; LUO, Y. *et al.* SCF promotes the production of IL-13 via the MEK-ERK-CREB signaling pathway in mast cells. **Exp Ther Med**, 18, n. 4, p. 2491-2496, Oct 2019.

WEILER, C. R.; KITA, H.; HUKKEE, M.; GLEICH, G. J. Eosinophil viability during immunoglobulin-induced degranulation. **J Leukoc Biol**, 60, n. 4, p. 493-501, Oct 1996. Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

WELLER, P. F.; SPENCER, L. A. Functions of tissue-resident eosinophils. **Nat Rev Immunol**, 17, n. 12, p. 746-760, Dec 2017.

WILLEBRAND, R.; VOEHRINGER, D. Regulation of eosinophil development and survival. **Curr Opin Hematol**, 24, n. 1, p. 9-15, 01 2017.

WILLS-KARP, M.; LUYIMBAZI, J.; XU, X.; SCHOFIELD, B. *et al.* Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. **Science**, 282, n. 5397, p. 2258-2261, 1998.

WOERLY, G.; LACY, P.; YOUNES, A. B.; ROGER, N. *et al.* Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation. **J Leukoc Biol**, 72, n. 4, p. 769-779, Oct 2002. Research Support, Non-U.S. Gov't.

WU, Z.; LI, Y.; MACNEIL, A. J.; JUNKINS, R. D. *et al.* Calcineurin-Rcan1 interaction contributes to stem cell factor-mediated mast cell activation. **J Immunol**, 191, n. 12, p. 5885-5894, Dec 15 2013.

YAMAGUCHI, Y.; SUDA, T.; SUDA, J.; EGUCHI, M. *et al.* Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. **The Journal of experimental medicine**, 167, n. 1, p. 43-56, 1988.

ZHENG, T.; ZHU, Z.; WANG, Z.; HOMER, R. J. *et al.* Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. **Journal of Clinical Investigation**, 106, n. 9, p. 1081, 2000.

**PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS ELABORADOS
DURANTE O DOUTORADO**



single-cell analyses of human eosinophils at high resolution to Understand compartmentalization and Vesicular Trafficking of interferon-gamma

Lívia A. S. Carmo¹, Kennedy Bonjour¹, Lisa A. Spencer², Peter F. Weller² and Rossana C. N. Melo^{1,2*}

¹Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil,

²Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Fabio Luciani,
University of New South
Wales, Australia

Reviewed by:

Claudia Ida Brodskyn,
Fundação Oswaldo Cruz
(Fiocruz), Brazil
Nina Ivanovska,
Institute of Microbiology
(BAS), Bulgaria

*Correspondence:

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

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Innate Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 30 March 2018

Accepted: 21 June 2018

Published: 09 July 2018

Citation:

Carmo LAS, Bonjour K, Spencer LA,
Weller PF and Melo RCN (2018)
Single-Cell Analyses of Human
Eosinophils at High Resolution to
Understand Compartmentalization
and Vesicular Trafficking of
Interferon-Gamma.
Front. Immunol. 9:1542.
doi: 10.3389/fimmu.2018.01542

Human eosinophils release numerous cytokines that are pre-synthesized and stored within their cytoplasmic-specific (secretory) granules. For example, high levels of interferon-gamma (IFN- γ) are constitutively expressed in these cells, but the intracellular compartments involved in the transport and release of this cytokine remain to be established. In this work, we used a single-cell approach to investigate the subcellular localization of IFN- γ in human eosinophils stimulated or not with tumor necrosis factor alpha (TNF- α) or CC-chemokine ligand 11 CCL11 (eotaxin-1), inflammatory mediators that induce eosinophil activation and secretion. A pre-embedding immunonanogold transmission electron microscopy (TEM) technique that combines optimal epitope preservation and access to membrane microdomains was applied to detect precise localization of IFN- γ in combination with computational quantitative analyses. In parallel, degranulation processes and formation of eosinophil sombrero vesicles (EoSvs), large transport carriers involved in the transport of granule-derived cytokines, were investigated. Quantitative TEM revealed that both CCL11 and TNF- α -activated eosinophils significantly increased the total number of EoSvs compared to the unstimulated group, indicating that this vesicular system is actively formed in response to cell activation. Ultrastructural immunolabeling identified a robust pool of IFN- γ on secretory granules in both unstimulated and stimulated cells. Moreover, EoSvs carrying IFN- γ were seen around or/and in contact with secretory granules and also distributed in the cytoplasm. Labeling was clearly associated with EoSv membranes. The total number of IFN- γ -positive EoSvs was significantly higher in stimulated compared to unstimulated cells, and these labeled vesicles had a differential distribution in the cytoplasm of activated cells, being significantly higher in the cell periphery compared with the inner cell, thus revealing intracellular IFN- γ mobilization for release. IFN- γ extracellular labeling was found at the cell surface, including on extracellular vesicles. Our results provide direct evidence that human eosinophils compartmentalize IFN- γ within secretory granules and identify, for the first time, a vesicular trafficking of IFN- γ associated with large transport carriers. This is important to understand how IFN- γ is trafficked and secreted during inflammatory responses.

Keywords: cytokines, cell activation, degranulation, inflammation, immunonanogold electron microscopy, eosinophil, leukocytes, interferon-gamma

inTRODUcTiOn

Eosinophils are terminally differentiated cells of the innate immune system with a broad distribution in tissues and varied functions related to both immune homeostasis and immunity [reviewed in Ref. (1–3)]. Eosinophils are sources of cytokines that are mostly stored as preformed pools within secretory (specific) granules, a robust population of large and morphologically distinctive granules, existent in the eosinophil cytoplasm [reviewed in Ref. (4)]. By mobilizing intracellular stores of preformed cytokines, human eosinophils have the capability of immediate release of these immune mediators in response to cell activation without the necessity for *de novo* synthesis [reviewed in Ref. (4–6)].

Human eosinophils are equipped with an arsenal of preformed Th1, Th2, and regulatory cytokines [reviewed in Ref. (4–6)]. The capacity and significance of these innate immune granulocytes to secrete specific cytokines have been recognized for mediating diverse immune-related responses. Interferon- γ (IFN- γ), a cytokine that acts as both an inducer and a regulator for inflammation (7, 8), is one major product of human eosinophils (9). In a previous work, we showed that high levels of this Th1-associated cytokine are constitutively expressed in human circulating eosinophils and that IFN- γ signals, detected after subcellular fractionation, colocalize in granule-enriched fractions as well as in lighter cytoplasmic fractions (9). However, the intracellular compartments involved in the transport and release of this cytokine remain to be established.

Because vesicular transport of products from secretory granules underlies secretion in eosinophils and other leukocytes, a challenge to comprehend this secretory pathway has been the identification of granule-originated products in vesicular compartments [reviewed in Ref. (10)]. Our group has been using a pre-embedding immunogold electron microscopic technique to understand the cellular mechanisms involved in the trafficking and release of immune mediators from human eosinophils activated by inflammatory stimuli (11–16). Application of this single-cell technique, which combines several strategies for ultrastructure and antigen preservation and improved antibody penetration for detecting molecules at subcellular compartments and membrane microdomains (17), has been providing substantial insights into eosinophil content of immune mediators and their compartmentalization [reviewed in Ref. (10)].

In the present work, we used this approach to understand the intracellular distribution and trafficking of IFN- γ at a single-cell level within human eosinophils stimulated or not with inflammatory stimuli, which are recognized to induce eosinophil activation and secretion: the CC-chemokine ligand 11 CCL11 (eotaxin-1) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (9, 18–21).

We found that IFN- γ is compartmentalized not only in secretory granules but also in eosinophil sombrero vesicles (EoSVs), large, granule-derived tubular carriers, typical of human eosinophils (22). An active transport of IFN- γ associated with EoSVs was identified in response to eosinophil activation.

MaTerials and MeThODs

eosinophil isolation, stimulation, and Viability

Granulocytes were isolated from peripheral blood of allergic or healthy donors. Eosinophils were enriched and purified by negative selection using the human eosinophil enrichment cocktail (SSep™, StemCell Technologies, Seattle, WA, USA) and the MACS bead procedure (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), as previously described (23) with the exception that hypotonic red blood cell (RBC) lysis was omitted to avoid any potential for RBC lysis to affect eosinophil function. Eosinophil viability and purity were greater than 99% as determined by ethidium bromide (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) incorporation and cytocentrifuged smears stained with HEMA 3 stain kit (Fisher Scientific, Medford, MA, USA), respectively. Purified eosinophils (10^6 cells/mL) were stimulated with TNF- α (200 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or recombinant human CCL11 (100 ng/mL; R&D Systems), in RPMI-1640 medium plus 0.1% ovalbumin (Sigma, St. Louis, MO, USA), or medium alone at 37°C, for 1 h. At these concentrations, CCL11 and TNF- α induce consistent cell secretion (16).

ethics statement

This study was carried out in accordance with the ethical principles taken from the Declaration of Helsinki and written informed consent was obtained from donors. Institutional Review Board (IRB) approval was obtained from the Beth Israel Deaconess Medical Center Committee on Clinical Investigation (Boston, MA, USA).

antibody reagents

Mouse anti-human IFN- γ (clone B27, catalog number 554699) and irrelevant isotype control monoclonal antibodies (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA) were used for the ultrastructural immunodetection studies at concentrations of 5 μ g/mL. The secondary Ab for immunogold was an affinity-purified goat anti-mouse Fab fragment conjugated to 1.4-nm gold particles (1:100, Nanogold, Nanoprobes, Stony Brook, NY, USA).

conventional Transmission electron Microscopy (TEM)

For conventional TEM, isolated eosinophils were prepared as before (11, 24). Cells were fixed in a mixture of freshly prepared aldehydes (1% paraformaldehyde and 1.25% glutaraldehyde) in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h at room temperature (RT), embedded in 2% agar, and kept at 4°C for further processing. Agar pellets containing eosinophils were post-fixed in 1% osmium tetroxide in a sym-collidine buffer, pH 7.4, for 2 h at RT. After washing with sodium maleate buffer, pH 5.2, pellets were stained en bloc in 2% uranyl acetate in 0.05 M sodium maleate buffer, pH 6.0 for 2 h at RT, and washed in the same buffer as before prior to dehydration in graded ethanols and infiltration and embedding with a propylene oxide-Epon sequence (Eponate 12 Resin; Ted Pella, Redding, CA, USA). After polymerization at 60°C for 16 h, thin sections were cut using a diamond knife on an

ultramicrotome (Leica, Bannockburn, IL, USA). Sections were mounted on uncoated 200-mesh copper grids (Ted Pella) before staining with lead citrate and viewed with a transmission electron microscope (Tecnai Spirit G2, FEI/Thermo Fisher Scientific, Eindhoven, The Netherlands) at 60 kV.

cell Preparation for immunonanogold electron Microscopy (immunoEM)

For immunoEM, purified eosinophils were immediately fixed in fresh 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) (0.02 M sodium phosphate buffer, 0.15 M sodium chloride, pH 7.4) (17). Cells were fixed for 30 min at RT, washed in PBS and centrifuged at 1,500 *g* for 1 min. Samples were then resuspended in molten 2% agar in PBS and quickly recentrifuged. Pellets were immersed in 30% sucrose in PBS overnight at 4°C, embedded in OCT compound (Miles, Elkhart, IN, USA), and stored in -180°C liquid nitrogen for subsequent use.

Pre-embedding immunonanogold eM

As detailed before (17), pre-embedding immunolabeling was carried out before standard EM processing (postfixation, dehydration, infiltration, resin embedding, and resin sectioning). All labeling steps were carried out at RT on cryosections as before (17) as follows: (a) one wash in 0.02 M PBS, pH 7.4, 5 min; (b) immersion in 50 mM glycine in 0.02 M PBS, pH 7.4, 10 min; (c) incubation in a mixture of PBS and BSA (PBS-BSA buffer; 0.02 M PBS plus 1% BSA) containing 0.1% gelatin (20 min) followed by PBS-BSA plus 10% normal goat serum (NGS) (30 min)—(this step is crucial to block non-specific Ab-binding sites); (d) incubation with primary Ab (1 h); (e) blocking with PBS-BSA plus NGS (30 min); (f) incubation with secondary Ab (1 h); (g) washing in PBS-BSA (three times of 5 min each); (h) postfixation in 1% glutaraldehyde (10 min); (i) five washings in distilled water; (j) incubation with HQ silver enhancement solution in a dark room according to the manufacturer's instructions (Nanoprobes) (10 min). This step enables a nucleation of silver ions around gold particles. These ions precipitate as silver metal and the particles grow in size facilitating observation under TEM; (k) three washings in distilled water; (l) immersion in freshly prepared 5% sodium thiosulfate (5 min); (m) postfixation with 1% osmium tetroxide in distilled water (10 min); (n) staining with 2% uranyl acetate in distilled water (5 min); (o) embedding in Eponate (Eponate 12 Resin; Ted Pella); (p) after polymerization at 60°C for 16 h, embedding was performed by inverting eponate-filled plastic capsules over the slide-attached tissue sections; and (q) separation of eponate blocks from glass slides by brief immersion in liquid nitrogen. Thin sections were cut using a diamond knife on an ultramicrotome (Leica). Sections were mounted on uncoated 200-mesh copper grids (Ted Pella) before staining with lead citrate and viewed with a transmission electron microscope (CM 10; Philips) at 60 kV. Two controls were performed: (1) primary Ab was replaced by an irrelevant Ab and (2) primary Ab was omitted. Electron micrographs were randomly taken at different magnifications to study the entire cell profile and subcellular features.

Quantitative eM analysis

For immunonanogold EM quantitative studies, electron micrographs randomly taken from unstimulated and stimulated eosinophils were evaluated. A total of 93 electron micrographs (29 from unstimulated, 34 from CCL11-stimulated, and 30 from TNF- α -stimulated cells) and 4,095 secretory granules (1,260 from unstimulated, 1,499 from CCL11-stimulated, and 1,336 from TNF- α -stimulated eosinophils) were evaluated and the numbers of labeled and non-labeled granules were counted.

Additionally, the total number of EoSVs and the numbers of EoSVs positive for IFN- γ were quantitated in two cytoplasmic areas: peripheral cytoplasm (within 1.0 μ m of the plasma membrane), and within the inner cytoplasm (the contiguous cytoplasmic area deeper in the cell). These analyses were done in clear cross-cell sections (total of 30 cells, $n = 1,357$ EoSVs) exhibiting the entire eosinophil cell profile, intact plasma membranes and nuclei as previously performed for single-cell analyses at a high resolution of immunogold-labeled cells (16). All quantitative studies were done using the *ImageJ* software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

statistical analyses

ANOVA followed by Turkey multiple comparisons test, or Kruskal-Wallis test was performed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com). Significance was $P < 0.05$.

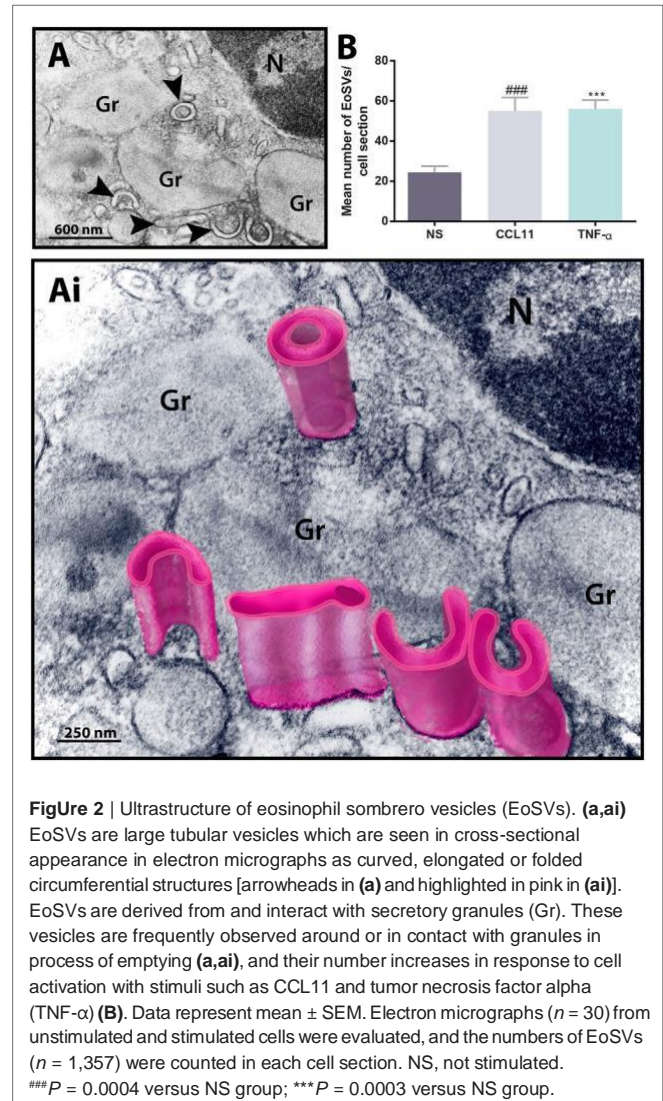
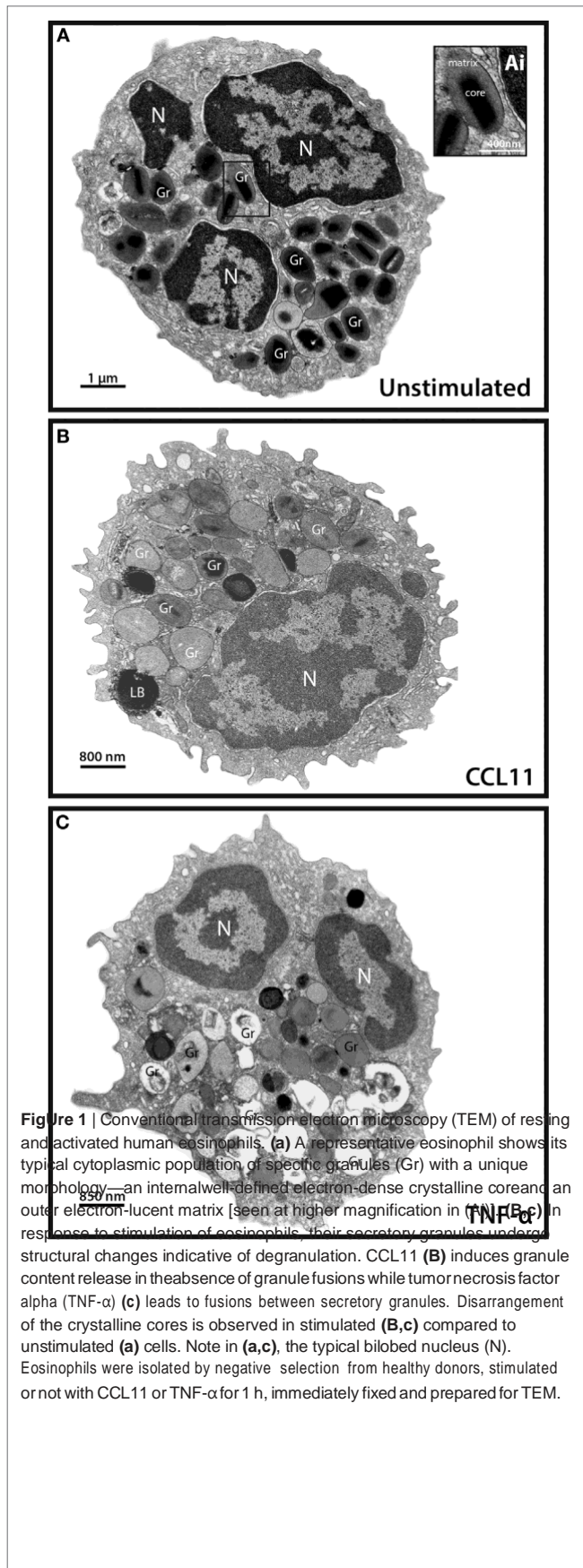
resUlTs

eosinophil activation leads to Degranulation and Formation of large Tubular carriers

Degranulation events in different types of secretory cells, including cells from the immune system, can be observed by means of single-cell analyses through TEM that clearly shows secretory granules exhibiting losses of contents in activated cells [reviewed in Ref. (4)]. As expected and documented before for CCL11 (11, 16) and TNF- α (16), these stimuli led to granule mobilization and content release (Figure 1). While resting eosinophils showed most granules with typical ultrastructure, that is, with an electron-dense, crystalline core in their equatorial region embedded in a less dense matrix, delimited by a typical membrane (Figure 1A), activated, degranulating eosinophils exhibited granules with ultrastructural features indicative of cell secretion [reviewed in Ref. (4, 25)]. CCL11 led to emptying of granules with morphological features of piecemeal degranulation such as enlargement and reduced electron-density of secretory granules in the absence of granule fusions (Figure 1B) (11, 25) while TNF- α triggered compound exocytosis, characterized by fusion of a number of granules with each other forming large channels in the cytoplasm (Figure 1C) (16).

To get more evidence of eosinophil activation, we also analyzed

the population of cytoplasmic EoSVs in samples conventionally prepared for EM. Because these tubular carriers have a large size and typical morphology, seen as elongated, curved, or folded circumferential structures (12, 22) (Figures 2A,Ai), the number



of these carriers can be easily enumerated by means of single-cell analyses. Quantitative TEM revealed that both CCL11 and TNF- α -activated eosinophils significantly amplified the numbers of cytoplasmic EoSVs compared to the unstimulated group (Figure 2B), confirming that this vesicular system is actively formed in response to cell activation with inflammatory mediators (12, 16).

secretory granules are consistently labeled for IFN- γ in Both Unstimulated and stimulated cells

We next performed pre-embedding immunogold EM for single-cell investigation of subcellular compartments labeled for IFN- γ using a protocol developed by us for optimal antigen and cell morphology preservation (17). A total of 93 cells were randomly analyzed. We found positive sites for IFN- γ in 100% of the cells, regardless of whether the eosinophils were stimulated or not, while control cells, for which the primary antibody was replaced by an irrelevant antibody, were negative or showed

negligible labeling (Figure SA in Supplementary Material). Secretory granules were remarkably labeled for IFN- γ . By using software for enumerating these granules, we detected that most

of them (more than 70%) in each cell section were positive for IFN- γ in both unstimulated and stimulated cells (Figures 3A-C). Unstimulated cells showed 33.2 ± 1.7 IFN- γ -positive granules/

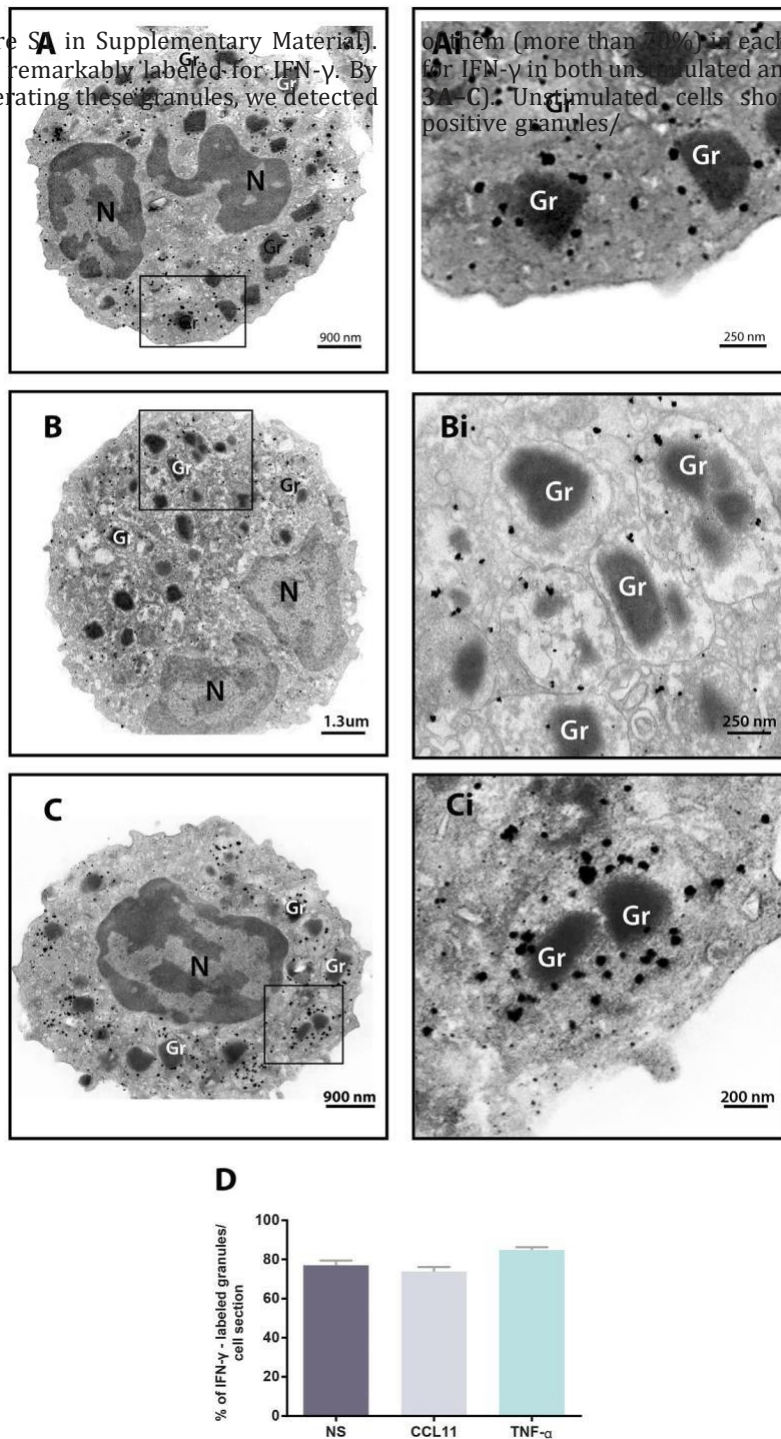


Figure 3 | Immunolocalization of IFN- γ in unstimulated and stimulated human eosinophils. (a–c) Single-cell analyses at high-resolution reveal a robust labeling of IFN- γ within secretory granules of unstimulated (a) and CCL11- (b) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α)- (c) activated eosinophils. The boxed areas in (a–c) are shown at higher magnification in (ai–ci). Gr, secretory granule. N, nucleus. (D) More than 70% of the granules were positive for IFN- γ . Data represent mean \pm SEM. NS, not stimulated. Cells were isolated from the peripheral blood, stimulated or not with CCL11 or TNF- α , and prepared for pre-embedding immunogold EM.

cell section corresponding to $77.1 \pm 2.4\%$ of the total number of granules (mean \pm SEM, $n = 29$ cells) whereas CCL11- and TNF- α -activated cells had 32.4 ± 1.6 and 37.6 ± 2.0 IFN- γ -positive granules/cell section, respectively, corresponding to 73.7 ± 2.3 and $84.9 \pm 1.3\%$ of the total number of granules (mean \pm SEM, $n = 34$ and 30 for CCL11 and TNF- α) (**Figure 3D**). Labeling was seen within the granules (matrix) and also at the granule limiting membranes (**Figures 3Ai-Ci**).

identification of a Vesicular Trafficking of IFN- γ Within human eosinophils

In addition to immunolocalization in secretory granules, our immunonanogold EM approach revealed clear labeling for IFN- γ on EoSVs (**Figure 4**). Vesicles carrying IFN- γ were seen around or/and in contact with secretory granules and also distributed in the cytoplasm (**Figures 4A,B**). Immunolabeling was markedly associated with the vesicle membranes (**Figures 4Ai,Bi**). We next evaluated whether the population of IFN- γ -positive vesicles changed in the stimulated groups compared to unstimulated eosinophils. Our quantitative analyses revealed that the numbers of IFN- γ -positive EoSVs increased in response to cell activation. While the unstimulated group had 8.6 ± 1.5 of IFN- γ -positive EoSVs per cell section (mean \pm SEM, $n = 10$ cells), these numbers were 20.3 ± 2.7 (mean \pm SEM, $n = 10$ cells) and 23.5 ± 2.8 (mean \pm SEM, $n = 10$ cells) for CCL11- and TNF- α -stimulated groups, respectively (**Figure 4C**). This means that the numbers of EoSVs transporting IFN- γ per cell section had more than 200% increase in the cytoplasm in response to cell activation.

Next, we hypothesized that if a specific vesicular system is actively trafficking IFN- γ from the secretory granules for extra-cellular release in response to cell activation, these vesicles would present a differential distribution in the cytoplasm. We then quantitated the numbers of IFN- γ -labeled EoSVs per cytoplasm region and in fact found that these numbers were increased in the peripheral cytoplasm (within $1.0 \mu\text{m}$ of the plasma membrane) compared to the adjacent cytoplasmic area deeper in the cell (**Figure 4D**). Moreover, we found extracellular labeling for IFN- γ at the cell surface, indicative of cytokine release (**Figures 4A and 5**). Extracellular vesicles (EVs) positive for IFN- γ were occasionally found (**Figure 5**).

Discussion

Precise immunolocalization of cytokines in cells from the immune system, such as eosinophils, is of critical importance to understand the capabilities of these cells during immune responses. These data presented in this work demonstrate, for the first time, that IFN- γ is mobilized and traffics in granule-derived vesicles upon cell activation. Our data also provide direct evidence that IFN- γ is constitutively stored in human eosinophils.

Here, we show that unstimulated eosinophils have a substantial pool of IFN- γ compartmentalized within secretory granules, in accordance with previous work (9). In fact, cytokines and other immune mediators are mostly stored within human eosinophils as intragranular preformed pools, from where they are mobilized, transported across the cytoplasm, and released [reviewed

in Ref. (10, 26)]. Thus, eosinophil cytokines represent a group of unconventionally secreted proteins, which are released from secretory granules *via* mechanisms operating independently of the endoplasmic reticulum/Golgi complex. Complete characterization of this nonclassical protein export route and its molecular machinery is still lacking mainly due to technical challenges such as inadequate preservation of intracellular membranous micro-domains and an inability of antibodies to access them (17). With the use of technical improvements and single-cell analyses at high resolution by immunonanogold EM, the intricate secretory pathway within human eosinophils has been uncovered [reviewed in Ref. (10, 26)]. Our protocol for ultrastructural detection of IFN- γ employs very small gold particles (1.4 nm in diameter) covalently conjugated with Fab fragments, which are only one-third the size of a whole IgG molecule (17). These probes improve antibody penetration and provide effective labeling of small compartments (27, 28). Moreover, we performed immunolabeling before any EM procedure, which is adequate for optimal preservation of certain types of antigens such as cytokines (17).

The present work expands our understanding that a large population of membrane-bound tubular vesicles (EoSVs) is involved in the intracellular transport of granule-stored cytokines in human eosinophils. Previous works from our group have demonstrated that EoSVs are also shuttling IL-4 (12) and other immune mediators such as major basic protein, a cationic protein that is the main constituent of the crystalloid cores of specific granules (14) and CD63, a member of the transmembrane-4 glycoprotein superfamily (tetraspanins), which is considered a marker for cell secretion (16). EoSVs are, therefore, directly involved in the traffic of granule-derived products within human eosinophils.

To elicit eosinophil secretion, we stimulated the cells with CCL11 or TNF- α . Both cytokines are well-known inducers of eosinophil activation and release of specific products from eosinophil secretory granules (9, 15, 18, 19, 21), including secretion of IFN- γ (9). In fact, by investigating the differential patterns of cytokine release from human eosinophils, we found that a large quantity of IFN- γ was secreted in response to Th1, Th2, and inflammatory stimuli (9). TNF- α proved to be a vigorous stimulus, triggering secretion of IL-4, IL-6, and IFN- γ from these cells (9). Moreover, TNF- α was considered central for IFN- γ -induced secretion of Th1-type chemokines and to increase IL-4-induced secretion of Th2-type chemokines by human eosinophils (21).

One interesting aspect of eosinophil activation is the increase in numbers of EoSVs in the cytoplasm [reviewed in Ref. (29)]. Both CCL11 and TNF- α led to the formation of EoSVs. It is now clear that EoSVs are useful morphological markers for human eosinophil activation [reviewed in Ref. (29)] being found in increased numbers even within naturally activated eosinophils from patients with hypereosinophilic syndrome when compared to normal donors (14).

The present work not only confirms the increase of the total number of cytoplasmic EoSVs but also demonstrates that the number of IFN- γ -positive EoSVs is augmented in response to cell activation (**Figure 4C**). The identification of this event was made possible with single-cell analyses at high resolution, thus

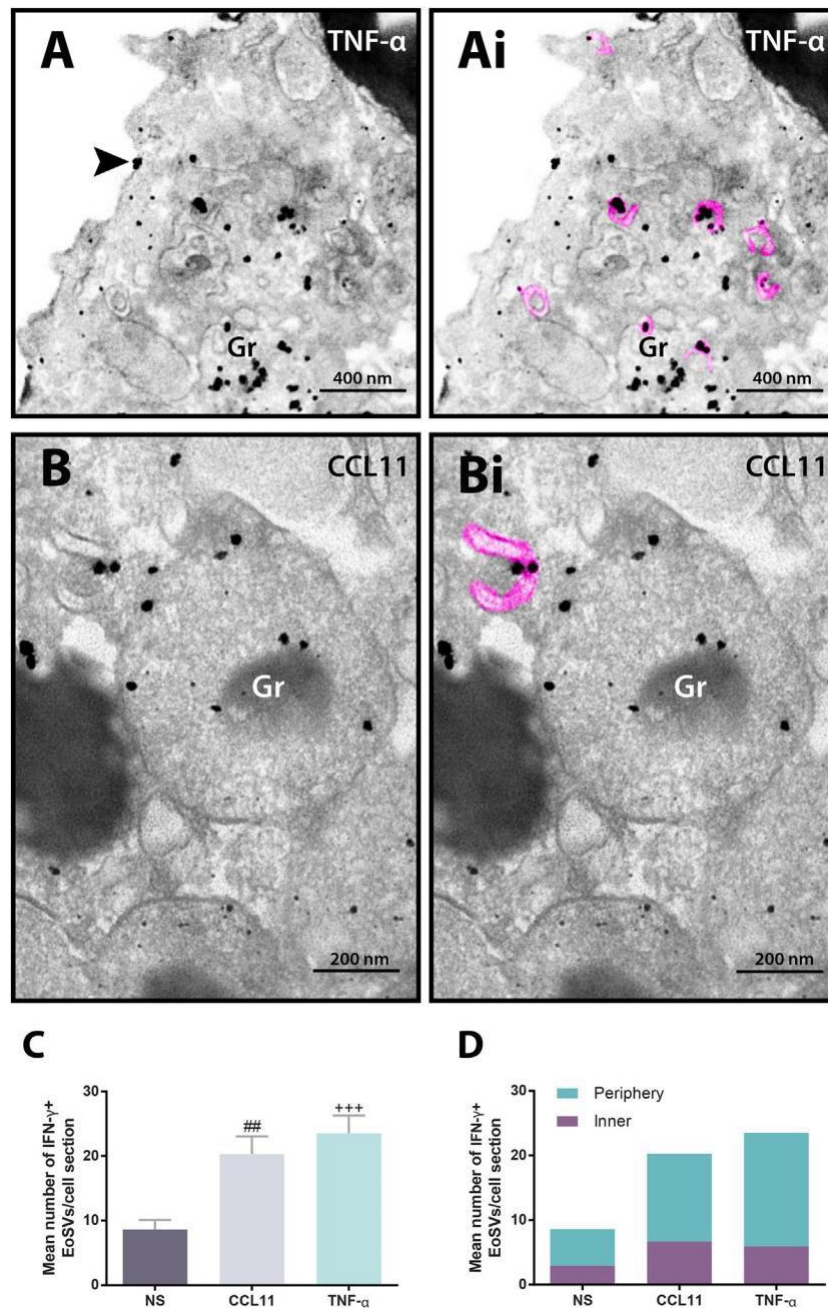


Figure 4 | Vesicular trafficking of IFN- γ in the cytoplasm of human eosinophils. IFN- γ -positive Eosinophil Sombbrero Vesicles (EoSvs) [highlighted in pink in **(ai)** and **(Bi)**] are seen in activated cells after stimulation with tumor necrosis factor alpha (TNF- α) **(a)** or CCL11 **(B)**. Note that labeling is mostly associated with the vesicle membranes. EoSvs carrying IFN- γ are distributed in the peripheral cytoplasm **(a)** and in close association with secretory granules (Gr) undergoing release of their contents **(a,B)**. **(c)** After stimulation, the total numbers of IFN- γ -positive EoSvs significantly increased. **(D)** Most EoSvs immunolabeled for IFN- γ were observed in the cell periphery. Arrowhead in **(a)** indicates extracellular release of IFN- γ . Data represent mean \pm SEM. NS, not stimulated. The numbers of labeled and not labeled EoSvs ($n = 1,357$ vesicles) were counted in cell sections ($n = 30$). ^{##} $P = 0.0051$ versus NS group; ⁺⁺⁺ $P = 0.0004$ versus NS group. Cells were isolated from the peripheral blood, stimulated or not with CCL11 or TNF- α , and prepared for pre-embedding immunogold EM.

highlighting this tool to advance our understanding of immune cell biology. A single-cell investigation also enabled definition of the distribution of EoSvs involved in the transport of IFN- γ across the cytoplasm. We found more labeled vesicles in the peripheral cytoplasm (within a band of just 1 μ m wide from

the plasma membrane) **(Figure 4D)** compared to the rest of the cytoplasm. This differential distribution denotes the occurrence of a robust traffic of this cytokine from secretory granules to the cell periphery for extracellular release. In fact, our approach captured IFN- γ at the cell surface **(Figures 4A and 5)**.

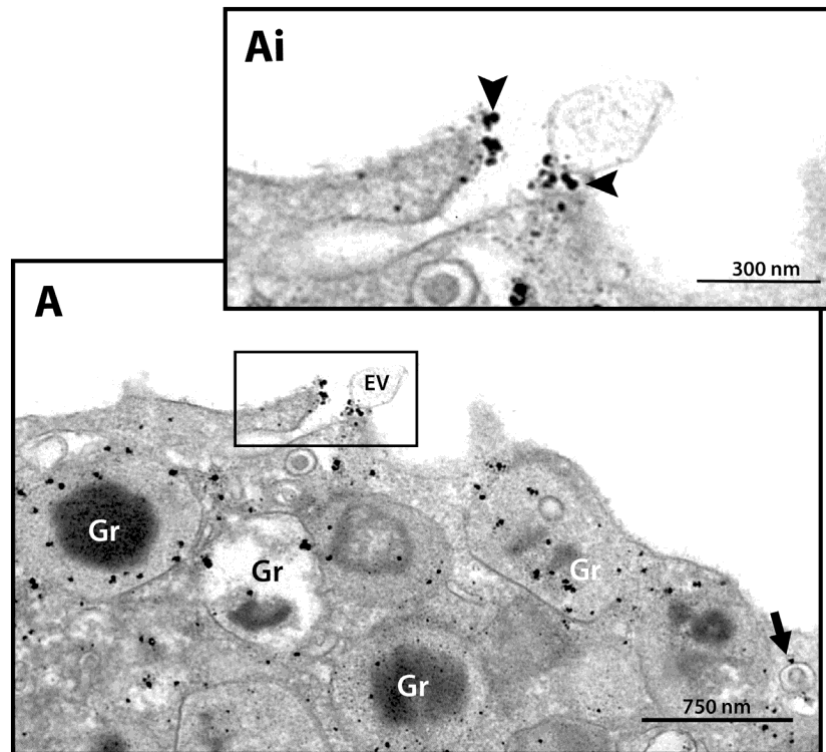


Figure 5 | Extracellular immunodetection of IFN- γ in human eosinophils. A representative electron micrograph shows IFN- γ at the cell surface (arrowheads). A labeled extracellular vesicle (EV) is also observed. The arrow indicates an IFN- γ -positive EoSV. Note the clear labeling at its delimiting membrane. Secretory emptying granules (Gr) are prominently labeled. The boxed area in (a) is shown in (ai) in higher magnification. Eosinophils were isolated from the peripheral blood, stimulated with CCL11 and prepared for pre-embedding immunanogold EM.

Interestingly, EVs, very small membrane-delimited vesicles, labeled for IFN- γ were also seen (**Figure 5**). In a previous work, we demonstrated that human eosinophils activated with inflammatory stimuli such as CCL11 and TNF- α release EVs, although their cargos were not addressed (30). In the present study, we provide evidence that EVs may be trafficking cytokines as previously suggested and potentially contributing to inflammation [reviewed in Ref. (31)]. In fact, single-cell analyses using immunanogold EM may be useful to further investigate IFN- γ trafficking and release during different inflammatory conditions, including within the context of tissue inflammation, not only in human eosinophils but also in other cells from the immune system. This is important to understand the complex role of IFN- γ during inflammation.

Finally, single-cell imaging of IFN- γ -positive EoSVs drew

our attention to the fact that immunolabeling was preferentially detected at vesicle membranes (**Figures 4A,B** and **5**). EoSVs act as suitable intracellular carriers to accommodate membrane-bound proteins because of their curved and elongated morphology with a higher surface-to-volume ratio (22). The membrane-associated transport of IFN- γ likely reflects the presence of IFN γ R alpha chains on EoSV membranes. It is known that intracellular receptors specific for different eosinophil-derived mediators are expressed in human eosinophils (13).

The recognition of pools of ligand-binding cytokine receptor chains such as IL-4R alpha (13) on eosinophil secretory granules uncovers mechanisms for selective chaperoned release of cytokines. Secretory granules isolated from human eosinophils likewise express domains of IFN- γ receptors alpha chain on their membranes (32), and it is probable that EoSVs arising from granules are also carrying these receptors. However, the presence of IFN- γ receptors on membranes of EoSVs remains to be addressed in future studies.

Taken together, our findings at a single-cell level identify subcellular compartments within human eosinophils involved in the storage and trafficking of IFN- γ , with detection of a robust granule-derived vesicular transport for this cytokine in response to cell activation. This is important to understand how IFN- γ is trafficked and secreted during inflammatory responses.

eThics sTaTeMent

This study was carried out in accordance with the ethical principles taken from the Declaration of Helsinki and written informed consent was obtained from donors. Institutional Review Board (IRB) approval was obtained from the Beth Israel Deaconess Medical Center Committee on Clinical Investigation (Boston, MA, USA).

aUThOr cOnTriBUTiOnS

RM provided the study conception and design, and performed experiments. RM, LS, and PW provided critical editing of the manuscript. LC performed TEM analyses, acquired and analyzed the data. KB prepared and edited the figures. All authors contributed in part to writing and editing the manuscript and approved the final version.

acKnOWleDgMenTs

We gratefully acknowledge the Centro de Microscopia (UFMG, Brazil) and Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI, ICB, UFMG) for the use of their facilities.

reFerenCes

1. Rothenberg ME. Eosinophils in the new millennium. *J Allergy Clin Immunol* (2007) 119:1321–2. doi:10.1016/j.jaci.2007.03.035
2. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* (2013) 13:9–22. doi:10.1038/nri3341
3. Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol* (2017) 17:746–60. doi:10.1038/nri.2017.95
4. Spencer LA, Bonjour K, Melo RCN, Weller PF. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. *Front Immunol* (2014) 5:496. doi:10.3389/fimmu.2014.00496
5. Melo RCN, Liu L, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. *Allergy* (2013) 68:274–84. doi:10.1111/all.12103
6. Davoine F, Lacy P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front Immunol* (2014) 5:570. doi:10.3389/fimmu.2014.00570
7. Zhang J. Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *J Clin Invest* (2007) 117:871–3. doi:10.1172/JCI31860
8. Wilke CM, Wei S, Wang L, Kryczek I, Kao J, Zou W. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon-gamma. *Cancer Immunol Immunother* (2011) 60:1529–41. doi:10.1007/s00262-011-1104-5
9. Spencer LA, Szela CT, Perez SA, Kirchhoffer CL, Neves JS, Radke AL, et al. Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J Leukoc Biol* (2009) 85:117–23. doi:10.1189/jlb.01108058
10. Melo RCN, Weller PF. Vesicular trafficking of immune mediators in human eosinophils revealed by immunoelectron microscopy. *Exp Cell Res* (2016) 347:385–90. doi:10.1016/j.yexcr.2016.08.016
11. Melo RCN, Perez SA, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. *Traffic* (2005) 6:866–79. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00322.x
12. Melo RCN, Spencer LA, Perez SA, Ghiran I, Dvorak AM, Weller PF. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. *Traffic* (2005) 6:1047–57. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00344.x
13. Spencer LA, Melo RCN, Perez SA, Bafford SP, Dvorak AM, Weller PF. Cytokine receptor-mediated trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103:3333–8. doi:10.1073/pnas.0508946103
14. Melo RCN, Spencer LA, Perez SA, Neves JS, Bafford SP, Morgan ES, et al. Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. *Lab Invest* (2009) 89:769–81. doi:10.1038/labinvest.2009.40
15. Carmo LAS, Dias FF, Malta KK, Amaral KB, Shamri R, Weller PF, et al. Expression and subcellular localization of the Qa-SNARE syntaxin17 in human eosinophils. *Exp Cell Res* (2015) 337:129–35. doi:10.1016/j.yexcr.2015.07.003
16. Carmo LAS, Bonjour K, Ueki S, Neves JS, Liu L, Spencer LA, et al. CD63 is tightly associated with intracellular, secretory events chaperoning piecemeal

FUnDing

This work was supported by the National Institute of Health (NIH) grants R37AI020241 (PW), R01AI121186 (LS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) grant 477475/2013-2 and 469995/2014-9 (RM), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil, Grant number CBB-APQ-03647-16) (RM).

sUPPlEMenTArY MaTerial

The Supplementary Material for this article can be found online at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01542/full#supplementary-material>.

- degranulation and compound exocytosis in human eosinophils. *J Leukoc Biol* (2016) 100:391–401. doi:10.1189/jlb.3A1015-480R
17. Melo RCN, Morgan E, Monahan-Earley R, Dvorak AM, Weller PF. Pre-embedding immunogold labeling to optimize protein localization at subcellular compartments and membrane microdomains of leukocytes. *Nat Protoc* (2014) 9:2382–94. doi:10.1038/nprot.2014.163
 18. Egesten A, Blom M, Calafat J, Janssen H, Knol EF. Eosinophil granulocyte interaction with serum-opsonized particles: binding and degranulation are enhanced by tumor necrosis factor alpha. *Int Arch Allergy Immunol* (1998) 115:121–8. doi:10.1159/000023891
 19. Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ, Weller PF. Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J Immunol* (2001) 166:4813–7. doi:10.4049/jimmunol.166.8.4813
 20. Bandeira-Melo C, Perez SA, Melo RCN, Ghiran I, Weller PF. EliCell assay for the detection of released cytokines from eosinophils. *J Immunol Methods* (2003) 276:227–37. doi:10.1016/S0022-1759(03)00076-0
 21. Liu LY, Bates ME, Jarjour NN, Busse WW, Bertics PJ, Kelly EA. Generation of Th1 and Th2 chemokines by human eosinophils: evidence for a critical role of TNF-alpha. *J Immunol* (2007) 179:4840–8. doi:10.4049/jimmunol.179.7.4840
 22. Melo RCN, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *J Leukoc Biol* (2008) 83:229–36. doi:10.1189/jlb.0707503
 23. Bandeira-Melo C, Gillard G, Ghiran I, Weller PF. EliCell: a gel-phase dual antibody capture and detection assay to measure cytokine release from eosinophils. *J Immunol Methods* (2000) 244:105–15. doi:10.1016/S0022-1759(00)00264-7
 24. Dvorak AM, Monahan RA, Osage JE, Dickersin GR. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. II. Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cells, basophils, eosinophils, and the microvasculature. *Hum Pathol* (1980) 11:606–19. doi:10.1016/S0046-8177(80)80072-4
 25. Melo RCN, Weller PF. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histol Histopathol* (2010) 25:1341–54. doi:10.14670/HH-25.1341
 26. Melo RCN, Dvorak AM, Weller PF. Contributions of electron microscopy to understand secretion of immune mediators by human eosinophils. *Microsc Microanal* (2010) 16:653–60. doi:10.1017/S1431927610093864
 27. Hainfeld JF, Furuya FR. A 1.4-nm gold cluster covalently attached to antibodies improves immunolabeling. *J Histochem Cytochem* (1992) 40:177–84. doi:10.1177/40.2.1552162
 28. Baschong W, Stierhof YD. Preparation, use, and enlargement of ultrasmall gold particles in immunoelectron microscopy. *Microsc Res Tech* (1998) 42:66–79. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19980701)42:1<66::AID-JEMT8>3.0.CO;2-P
 29. Melo RCN, Weller PF. Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. *J Leukoc Biol* (2018) 104(1):85–93. doi:10.1002/JLB.3MR1217-476R

30. Akuthota P, Carmo LAS, Bonjour K, Murphy RO, Silva TP, Gamalier JP, et al. Extracellular microvesicle production by human eosinophils activated by “inflammatory” stimuli. *Front Cell Dev Biol* (2016) 4:117. doi:10.3389/fcell.2016.00117
31. Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* (2014) 10:356–64. doi:10.1038/nrrheum.2014.19
32. Neves JS, Perez SA, Spencer LA, Melo RCN, Reynolds L, Ghiran I, et al. Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105:18478–83. doi:10.1073/pnas.0804547105

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

Copyright © 2018 Carmo, Bonjour, Spencer, Weller and Melo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Extracellular Microvesicle Production by Human Eosinophils Activated by “Inflammatory” Stimuli

Praveen Akuthota^{1,2}, Lívia A. S. Carmo³, Kennedy Bonjour³, Ryann O. Murphy¹, Thiago P. Silva³, Juliana P. Gamalier³, Kelsey L. Capron¹, John Tigges⁴, Vasilis Toxavidis⁴, Virginia Camacho⁴, Ionita Ghiran¹, Shigeharu Ueki⁵, Peter F. Weller¹ and Rossana C. N. Melo^{1,3*}

¹ Division of Allergy and Inflammation, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA, ² Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA, ³ Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Institute of Biological Sciences (ICB), Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, ⁴ Flow Cytometry Core, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA, ⁵ Department of General Internal Medicine and Clinical Laboratory Medicine, Akita University Graduate School of Medicine, Akita, Japan

OPEN ACCESS

Edited by:

Kaushik Choudhuri,
University of Michigan Health System,
USA

Reviewed by:

Francisco Sanchez,
Universidad Autonoma de Madrid,
Spain

Marc Peters-Golden,
University of Michigan, USA
David Otaegui,
Biodonostia, Spain

*Correspondence:

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

Specialty section:

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

Received: 22 April 2016

Accepted: 07 October 2016

Published: 27 October 2016

Citation:

Akuthota P, Carmo LAS, Bonjour K, Murphy RO, Silva TP, Gamalier JP, Capron KL, Tigges J, Toxavidis V, Camacho V, Ghiran I, Ueki S, Weller PF and Melo RCN (2016) Extracellular Microvesicle Production by Human Eosinophils Activated by “Inflammatory” Stimuli. *Front. Cell Dev. Biol.* 4:117. doi: 10.3389/fcell.2016.00117

A key function of human eosinophils is to secrete cytokines, chemokines and cationic proteins, trafficking, and releasing these mediators for roles in inflammation and other immune responses. Eosinophil activation leads to secretion of pre-synthesized granule-stored mediators through different mechanisms, but the ability of eosinophils to secrete extracellular vesicles (EVs), very small vesicles with preserved membrane topology, is still poorly understood. In the present work, we sought to identify and characterize EVs released from human eosinophils during different conditions: after a culturing period or after isolation and stimulation with inflammatory stimuli, which are known to induce eosinophil activation and secretion: CCL11 (eotaxin-1) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). EV production was investigated by nanoscale flow cytometry, conventional transmission electron microscopy (TEM) and pre-embedding immunogold EM. The tetraspanins CD63 and CD9 were used as EV biomarkers for both flow cytometry and ultrastructural immunolabeling. Nanoscale flow cytometry showed that human eosinophils produce EVs in culture and that a population of EVs expressed detectable CD9, while CD63 was not consistently detected. When eosinophils were stimulated immediately after isolation and analyzed by TEM, EVs were clearly identified as microvesicles (MVs) outwardly budding off the plasma membrane. Both CCL11 and TNF- α induced significant increases of MVs compared to unstimulated cells. TNF- α induced amplified release of MVs more than CCL11. Eosinophil MV diameters varied from 20 to 1000 nm. Immunogold EM revealed clear immunolabeling for CD63 and CD9 on eosinophil MVs, although not all MVs were labeled. Altogether, we identified, for the first time, that human eosinophils secrete MVs and that this production increases in response to inflammatory stimuli. This is important to understand the complex secretory activities of eosinophils underlying immune responses. The contribution of the eosinophil-derived MVs to the regulation of immune responses awaits further investigation.

Keywords: cell secretion, inflammation, CCL11 (eotaxin-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), tetraspanins, CD63, CD9, transmission electron microscopy (TEM)

INTRODUCTION

Eosinophils, leukocytes of the innate immune system that are involved in the pathogenesis of asthma, allergies, and other diseases as well as other ongoing homeostatic roles in tissues, have a remarkable ability to secrete specific proteins in response to inflammatory stimuli. A plethora of mediators are stored as preformed molecules within eosinophil specific (secretory) granules, the singular granule population in the cytoplasm of these cells such as distinct cationic proteins and cytokines (reviewed in Spencer et al., 2014).

Some major mechanisms leading to secretion of granule-derived immune mediators have been well-characterized in human eosinophils. In response to cell activation, granules can fuse with the plasma membrane in order to secrete their contents, but the most frequent mechanism for the delivery of eosinophil mediators involve vesicular carriers, which recruit cargos directly from secretory granules, a secretory process termed piecemeal degranulation (reviewed in Melo and Weller, 2010; Melo et al., 2013a; Spencer et al., 2014). While the study of eosinophil degranulation processes has received great attention in the last decade, the ability of eosinophils to secrete membrane vesicles, collectively termed extracellular vesicles (EVs), remains to be explored.

Various names, including exosomes and microvesicles (MVs)/microparticles, have been given to secreted EVs. While the term exosomes is used for referring to a population of EVs, which are released from cells when multivesicular bodies (MVBs) fuse with the plasma membrane, the term MVs has been generally used for EVs formed by budding and shedding of the plasma membrane (reviewed in van der Pol et al., 2012; Twu and Johnson, 2014; Lawson et al., 2016). Recently, it was demonstrated that human eosinophils secrete exosomes in culture cell conditions and that this type of EV is increased in asthmatic patients, which links EVs with eosinophil activation (Mazzeo et al., 2015). However, the functions of EVs secreted by immune cells during inflammatory responses are still poorly understood. It is believed that these vesicles can act as carriers of cell-cell communication mediators such as cytokines and lipid mediators, and potentially contribute to inflammation (reviewed in Buzas et al., 2014). Moreover, a potential immunomodulatory role for treating or preventing inflammatory disorders has been attributed to EVs (Buzas et al., 2014).

EVs secreted by cells can be detected by nanoscale flow cytometric methods, which identify and sort submicron particles (Danielson et al., 2016) and transmission electron microscopy (TEM), which enables unambiguous visualization of EVs (reviewed in Lawson et al., 2016). EM is thus considered an essential technique to characterize EVs and to distinguish them from non-membranous particles of similar size, as endorsed by the International Society for EVs in an effort to provide minimal requirements for EV definition (Lötvall et al., 2014).

Our group has been using different EM techniques, including conventional TEM and immunonanogold EM, to understand mechanisms of vesicular trafficking and release of immune mediators from human eosinophils activated by inflammatory stimuli (Melo et al., 2005a,b, 2008a, 2009, 2010; Spencer et al.,

2006; Carmo et al., 2015). By studying the ultrastructure of human eosinophils isolated from the peripheral blood, we noticed the presence of EVs budding from the cell surface when the cells were kept alive in medium (**Figure 1**).

In the present work, we sought to identify and characterize EVs released from human eosinophils during different conditions: in culture and after stimulation with two distinct agonist “inflammatory” stimuli, which are known to induce eosinophil activation and secretion: the chemokine, CCL11 (eotaxin-1), and the cytokine, tumor necrosis factor alpha (TNF- α ; Egesten et al., 1998; Bandeira-Melo et al., 2001, 2003; Liu et al., 2007; Spencer et al., 2009). In recent work, we showed that these stimuli trigger increased formation of intracellular transport vesicles in association with distinct processes of eosinophil secretion (Carmo et al., 2016). We wondered if both stimuli are also able to influence the biogenesis of EVs. By performing a comprehensive study, using nanoscale flow cytometry, conventional TEM and immunonanogold labeling for CD63 and CD9, we demonstrate that human eosinophils produce EVs, which were clearly characterized as MVs, and that this production is increased in response to both CCL11 and TNF- α , identifying eosinophil EV genesis as a secretory mechanism with eosinophil-mediated immune responses.

MATERIALS AND METHODS

Eosinophil Isolation, Stimulation, and Viability

Granulocytes were isolated from peripheral blood of allergic or healthy donors. Eosinophils were enriched and purified by negative selection as previously described (StemSep™, StemCell Technologies, Seattle WA; Miltenyi Biotec, Auburn, CA; Bandeira-Melo et al., 2000; Akuthota et al., 2014). The hypotonic red blood cell (RBC) lysis was omitted to avoid any potential for RBC lysis to affect eosinophil function. Eosinophil viability and purity were >99% as determined by ethidium bromide (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA) incorporation and cytocentrifuged smears stained with HEMA 3 stain kit (Fisher Scientific, Medford, MA), respectively. Purified eosinophils (10⁶ cells/mL) were stimulated with TNF- α (200 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN) or recombinant human CCL11 (100 ng/mL; R&D Systems), in RPMI-1640 medium plus 0.1% ovalbumin (OVA; Sigma, St. Louis, MO, USA), or medium alone at 37 C, for 1 h as before (Carmo et al., 2016).

Ethics Statement

Written informed consent was obtained from donors in accordance with the Declaration of Helsinki, and Institutional Review Board (IRB) approval was obtained from the Beth Israel Deaconess Medical Center Committee on Clinical Investigation (Boston, MA, USA).

Antibody Reagents

Mouse anti-human IgG₁ CD63 (clone H5C6, catalog number 556019, 5 μ g/mL, BD-Pharmingen, San Diego, CA), mouse anti-human CD9 (clone 209306; R&D Systems, 10 μ g/mL, Minneapolis, MN) and irrelevant isotype control monoclonal

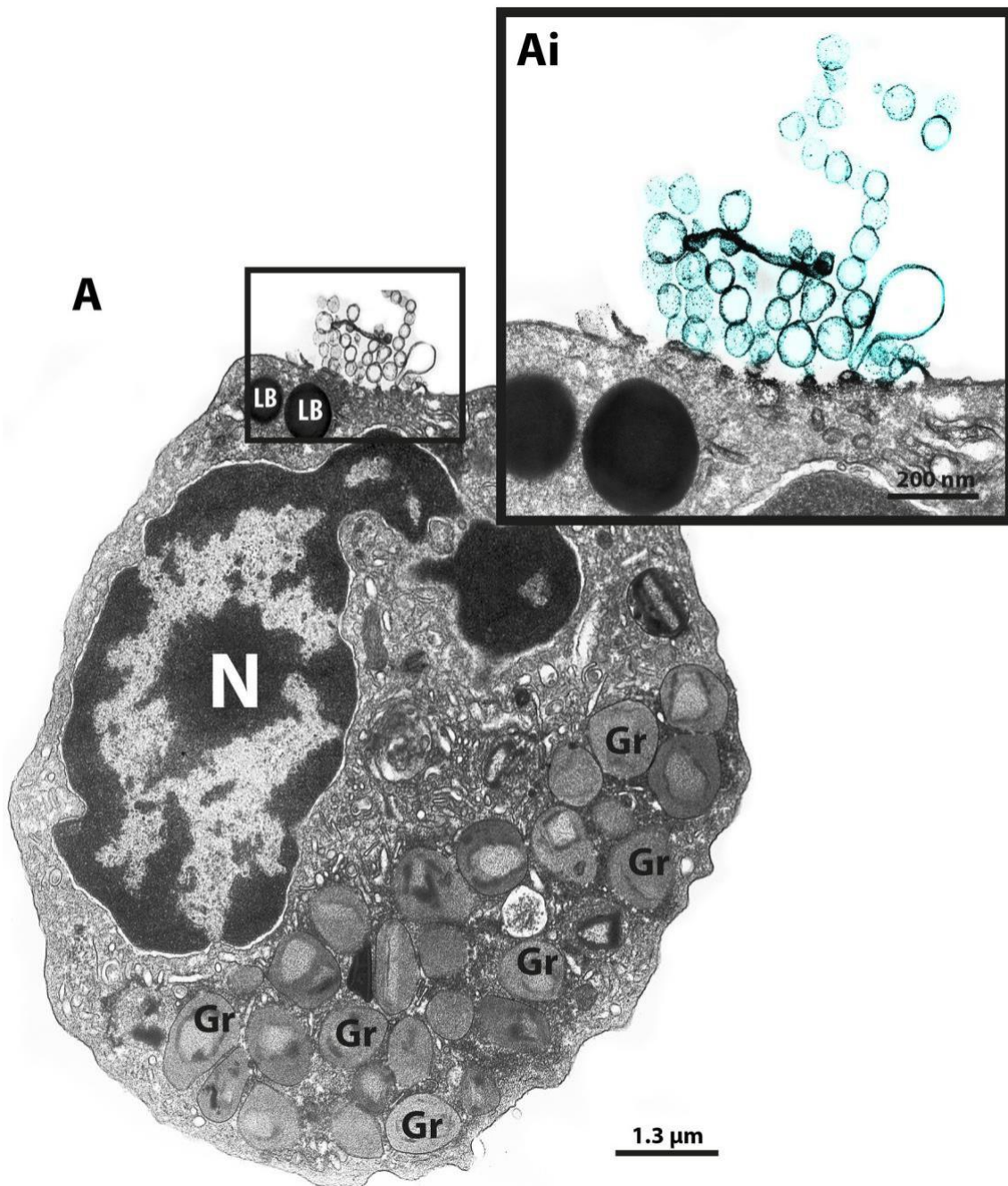


FIGURE 1 | TEM reveals production of MVs by human eosinophils. (A) A representative micrograph of a human eosinophil documents several MVs (highlighted in blue in Ai) budding directly from the plasma membrane. Eosinophil specific granules (Gr), the singular population of secretory granules in the cytoplasm, show lucencies in their granule cores, indicative of cell activation. Two lipid bodies (LB), which typically appear as very electron-dense organelles in eosinophils, are seen in the cell periphery. Eosinophils were isolated from the peripheral blood from healthy donors by negative selection, kept in medium during 1 h, immediately fixed while still in suspension and processed for conventional TEM. N, nucleus.

antibodies (mAbs) were used for electron microscopy immunodetection studies. The secondary Ab for immunoEM was an affinity-purified goat anti-mouse Fab fragment conjugated to 1.4 nm gold particles (1:100, Nanogold, Nanoprobes, Stony Brook, NY). FITC-conjugated mouse anti-human IgG₁ CD63

(clone H5C6, Biolegend, San Diego, CA), FITC-conjugated mouse anti-human IgG₁ CD9 (clone H19a, Biolegend), and irrelevant FITC-conjugated isotype control antibodies were used for nanoscale flow cytometry or regular flow cytometry.

Nanoscale Flow Cytometry

Human eosinophils were incubated for 4 days in RPMI-1640 with 5% FBS with 10 ng/mL IL-5 and 1 ng/mL of GM-CSF to allow for EV accumulation in the culture supernatant. Due to the presence of FBS, culture medium was depleted of EVs by ultracentrifugation prior to use. Supernatants were depleted of eosinophils and debris with successive centrifugation at 300

$\times g$, 5,600 $\times g$, and 11,000 $\times g$. EVs were then isolated by ultracentrifugation at 100,000 $\times g$ for 1 h. EV-depleted culture medium without cells present subjected to the same protocol served as a negative control. Prior to nanoscale flow cytometry, some samples were incubated with FITC-conjugated anti-CD9 antibody or FITC-conjugated anti-CD63 antibody. Nanoscale flow cytometry was performed as previously described using a Beckman Coulter MoFlo AstriosEQ modified to optimize detection of small particles down to 200 nm in diameter (Danielson et al., 2016). Control Latex Beads were obtained from Beckman Coulter. Electronic noise was gated out during analysis using the signal generated by phosphate buffered saline alone as a reference.

Flow Cytometry for CD63 in Entire Cells

For CD63 detection in human eosinophils by regular flow cytometry, cells were incubated 1:25 in relevant antibody or isotype control for 25 min at 4°C. Flow cytometry for CD63 was performed using a BD Accuri Flow Cytometer. Data were analyzed using FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, USA).

Conventional TEM

For conventional TEM, isolated eosinophils were prepared as before (Melo et al., 2005a, 2009). Cells were fixed in a mixture of freshly prepared aldehydes [1% paraformaldehyde (PFO) and 1.25% glutaraldehyde] in 0.1 M sodium cacodylate buffer (final concentration) for 1 h at RT, embedded in 2% agar and kept at

4°C for further processing. Agar pellets containing eosinophils

were post-fixed in 1% osmium tetroxide in sym-collidine buffer, pH 7.4, for 2 h at RT. After washing with sodium maleate buffer, pH 5.2, pellets were stained en bloc in 2% uranyl acetate in

0.05 M sodium maleate buffer, pH 6.0 for 2 h at RT and washed in the same buffer as before prior to dehydration in graded ethanols and infiltration and embedding with a propylene oxide-Epon sequence (Eponate 12 Resin; Ted Pella, Redding, CA). Sections were mounted on uncoated 200-mesh copper grids (Ted Pella) before staining with lead citrate and viewed with a transmission electron microscope (CM 10; Philips, Eindhoven, The Netherlands) at 60 kV.

Cell Preparation for Immunonanogold EM

For immunoEM, purified eosinophils were immediately fixed in fresh 4% PFO in PBS, pH 7.4 (Melo et al., 2014). Cells were fixed for 30 min at RT, washed in PBS and centrifuged at 1500 g for 1 min. Samples were then resuspended in molten 2% agar in PBS and quickly recentrifuged. Pellets

were immersed in 30% sucrose in PBS overnight at 4°C, embedded in OCT

compound (Miles, Elkhart, IN), and stored in -180°C liquid nitrogen for subsequent use.

Pre-embedding Immunonanogold EM

As detailed before (Melo et al., 2005b, 2009; Dias et al., 2014), pre-embedding immunolabeling was carried out before standard EM processing (post-fixation, dehydration, infiltration, resin embedding and resin sectioning). All labeling steps were carried out at RT as before (Melo et al., 2014) as follows: (a) one wash in 0.02 M PBS, pH 7.6, 5 min; (b) immersion in 50 mM glycine in 0.02 M PBS, pH 7.4, 10 min; (c) incubation in a mixture of PBS and BSA (PBS-BSA buffer; 0.02 M PBS plus 1% BSA) containing 0.1% gelatin (20 min) followed by PBS-BSA plus 10% normal goat serum (NGS; 30 min)—(this step is crucial to block non-specific Ab binding sites); (d) incubation with primary Ab (1 h); (e) blocking with PBS-BSA plus NGS (30 min); (f) incubation with secondary Ab (1 h); (g) washing in PBS-BSA (three times of 5 min each); (h) post-fixation in 1% glutaraldehyde (10 min); (i) five washings in distilled water;

(j) incubation with *HQ silver enhancement kit* (Nanoprobes) in a dark room according to the manufacturer's instructions (10 min). This step enables a nucleation of silver ions around gold particles. These ions precipitate as silver metal and the particles grow in size facilitating observation under TEM; (k) three washings in distilled water; (l) immersion in freshly prepared 5% sodium thiosulfate (5 min); (m) post-fixation with 1% osmium tetroxide in distilled water (10 min); (n) staining with 2% uranyl acetate in distilled water (5 min); (o) embedding in Eponate (Eponate 12 Resin; Ted Pella); (p) after polymerization at 60°C

for 16 h, embedding was performed by inverting eponate-filled plastic capsules over the slide-attached tissue sections; and (q) separation of eponate blocks from glass slides by brief immersion in liquid nitrogen. Thin sections were cut using a diamond knife on an ultramicrotome (Leica). Sections were mounted on uncoated 200-mesh copper grids (Ted Pella) before staining with lead citrate and viewed with a transmission electron microscope (CM 10; Philips) at 60 kV. Two controls were performed:

(1) primary Ab was replaced by an irrelevant Ab, and (2) primary Ab was omitted. Electron micrographs were randomly taken at different magnifications to study the entire cell profile and subcellular features.

Quantitative EM Analysis

For quantification studies by conventional TEM (enumeration of the total number of EVs and MVBs), electron micrographs of cell sections were randomly taken from unstimulated and stimulated eosinophils. Electron micrographs were taken by an operator blind to EV identification. A total of 110 electron micrographs (39 from unstimulated, 37 from CCL11- and 34 from TNF- α -stimulated eosinophils) and 516 EVs (55 from unstimulated, 187 from CCL11- and 274 from TNF- α -stimulated eosinophils) were counted. Then, the diameters of EVs were measured and grouped in different ranges (20–100, 100–200, 200–300, 300–1000 nm). The presence of typical MVBs was investigated in all electron micrographs. These analyses were done in clear cross-cell sections exhibiting the entire eosinophil cell profile, intact plasma membranes and nuclei. EVs were morphologically defined as intact, small round vesicles, delimited by a membrane unit, which is seen by TEM as a typical trilaminar structure, in process of outward budding from

the plasma membrane or closely associated with the cell surface.

For immunogold EM studies, a total of 69 electron micrographs randomly taken from unstimulated and stimulated eosinophils were evaluated for CD63 and CD9 labeling. These analyses were done in clear cross-cell sections exhibiting the entire eosinophil cell profile, intact plasma membranes, and nuclei.

All quantitative studies were performed using the *Image J* software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Protein Electrophoresis of EVs

For protein electrophoresis of EVs, culture supernatants of primary human eosinophils were collected and centrifuged as they were for nanoscale flow cytometry. Culture supernatant from an eosinophilic leukemia cell line (Eol-1, Sigma-Aldrich) was also collected and centrifuged. Lithium dodecyl sulfate sample buffer (4X; Invitrogen) and sample reducing agent (10X) (Invitrogen) were added at final 1X concentrations. Samples, first heated for 7.5 min at 95°C, were run on a 4–12% Bis-Tris

gel. Silver staining was then performed of polyacrylamide gel (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) were used to develop membranes.

Annexin V Analysis by Confocal Microscopy and Flow Cytometry

To detect exposed phosphatidylserine, cells were stained with annexin V (Gonzalez-Cano et al., 2010). Freshly isolated human eosinophils were resuspended in 5% FBS RPMI-1640 medium (10^6 cells/mL) and stimulated, as above, at 37°C

in 5% CO₂ incubator. Annexin V-FITC (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan) was then added to the culture medium (1:20) and cells were viewed without washing or fixing in an imaging chamber (Zell-kontakt, Nörten-Hardenberg, Germany). The confocal microscopic and differential interference contrast (DIC) images were captured using a laser scanning confocal microscope with incubation chamber (100x objective, Carl Zeiss LSM780, Jena, Germany). For flow cytometry, annexin V-FITC stained cells were measured using a flow cytometer (Cytomics FC500, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Data were analyzed by FlowJo software.

Tunel Assay

Eosinophils stimulated as described were fixed with 4% paraformaldehyde and stained using MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit (Medial Biological Laboratories, Nagoya, Japan) according to the manufacturer's instruction. Images were captured using a fluorescence microscope (40x objective, Leica DMI 4000B, Wetzlar, Germany).

Statistical Analyses

Comparison between groups was analyzed using Kruskal Wallis test followed by Dunn's test to adjust for multiple comparisons, as appropriate. The significance level was set at $P < 0.05$. All tests and graphs were performed with software Prism 6.0.1 (GraphPad software, San Diego, CA). Data are expressed as means \pm SEM.

RESULTS

Human Eosinophils Release EVs

Over the last decade, our research group has been studying the ultrastructure of human eosinophils during different conditions. Our EM methodology, primarily developed for studying human eosinophils isolated from the peripheral blood, includes prompt aldehyde fixation while the cells are still in suspension, which is important to optimal cell preservation and to capture specific biological events in response to varied stimuli (Melo et al., 2005a, 2013b). Thus, cells kept alive in suspension either unstimulated or agonist stimulated are immediately fixed after a determined time, before any subsequent centrifugation procedure, which could interfere with the cell morphology. While examining resulting electron micrographs from different experiments, we occasionally noticed clear shedding of small vesicles delimited by a typical phospholipid bilayer from the eosinophil surface (**Figure 1**).

We then decided to investigate whether eosinophils kept in culture were able to release EVs. Eosinophils isolated from the peripheral blood of healthy patients were incubated for

4 days in culture to allow EV accumulation in the culture supernatant. EVs isolated by ultracentrifugation were evaluated by nanoscale flow cytometry. Using standard latex beads, we first confirmed the ability of the nanoscale flow cytometry approach to discriminate small particles down to a size of 200 nm and lower (**Figure 2A**). After gating out electronic noise, EVs derived from human eosinophil cultures were identified (**Figures 2B–D**). On staining EVs with FITC-conjugated anti-CD9 or anti-CD63 antibodies, we found that EVs, that were identifiable and evaluated by nanoscale flow cytometry, had readily detectable CD9 (**Figure 2E**). A band at 25 kD, consistent with the presence of CD9 in these vesicles, was also detected by protein electrophoresis (Supplementary Figure 1). CD63 expression by eosinophil EVs was not detectable with nanoscale flow cytometry (**Figure 2F**). All nanoscale flow cytometry results were representative of four individual experiments from four individual normal donors (**Figure 2**). Positive controls for CD63 are shown in Supplementary Figure 2.

EV Production by Human Eosinophils Increases in Response to Inflammatory Stimuli

Next, to study the phenomenon of vesicle release and detect EVs at the cell surface, we stimulated freshly isolated eosinophils from normal donors during 1 h with CCL11 or TNF- α , at concentrations previously documented to induce secretion, or medium alone (Carmo et al., 2016) and immediately processed for conventional TEM. Then, electron micrographs randomly taken from the thin sections by an operator blind to EV identification and showing the entire cell profile and intact plasma membrane were carefully examined. First, conventional TEM revealed that EVs appeared mostly as MVs in both unstimulated (**Figure 3A**) and stimulated (**Figure 3B**) cells, that is, shedding directly from the plasma membrane. Typical MVs, delimited by a phospholipid membrane, were seen in progressive

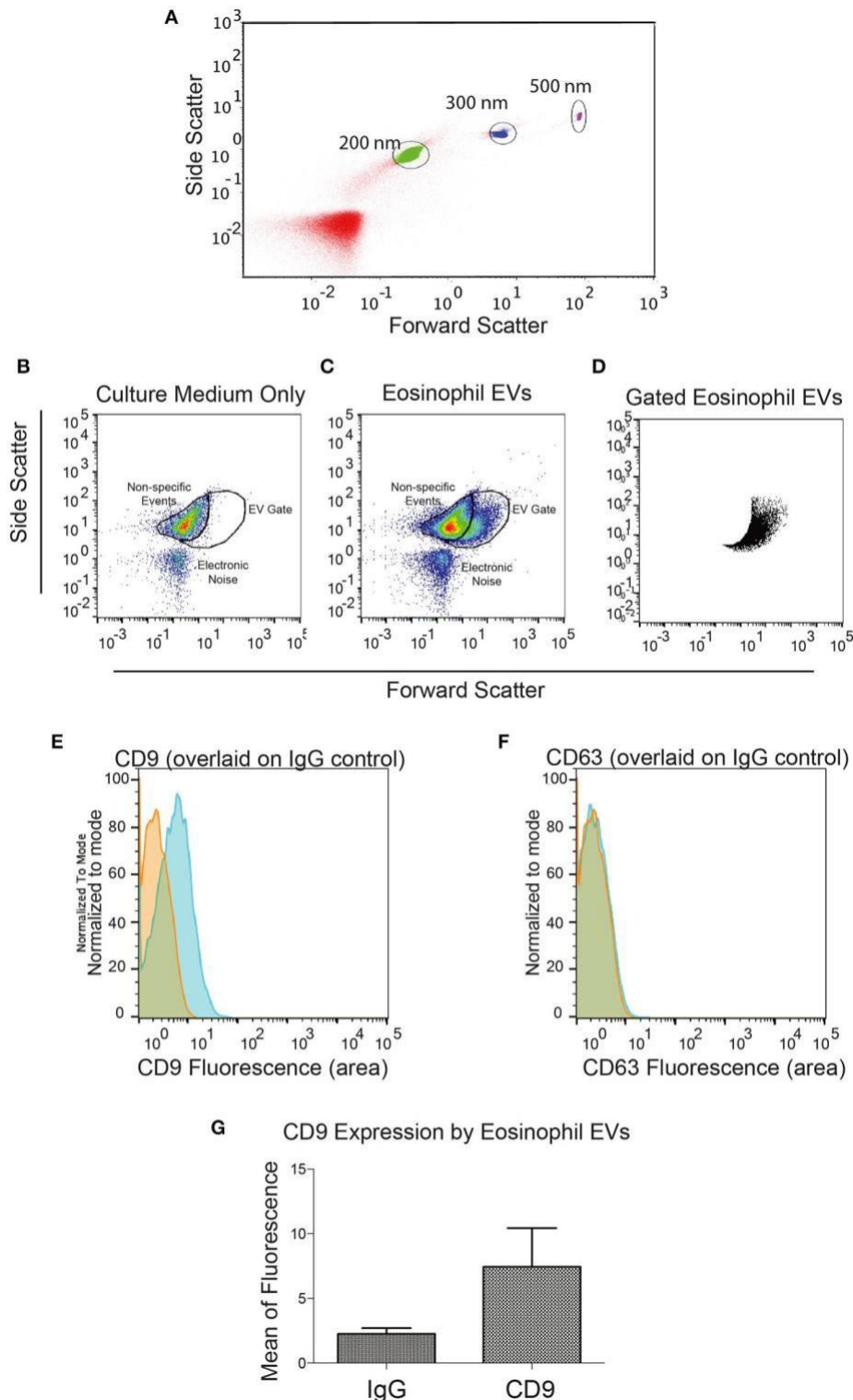


FIGURE 2 | Identification of Eosinophil EVs by Nanoscale Flow Cytometry. (A) The ability of the AstriosEQ to discriminate sub-micrometer particles is shown using a mixture of Control Latex Beads (200, 300, and 500 nm). (B) Flow cytometry of RPMI with FBS (EV-depleted) alone showing non-specific events and electronic noise. Forward scatter and side scatter plotted. (C) Flow cytometry of human eosinophil EVs in RPMI with FBS (EV-depleted). Gate drawn around EV signal (FSC and SSC plotted). (D) Gated eosinophil EVs. (E) Human eosinophil EVs CD9 expression (blue) overlaid on IgG control (red). (F) Human eosinophil CD63 expression (blue) overlaid on IgG control (red) shows minimal detection of CD63 by nanoscale flow cytometry. Representative of four experiments from four individual donors. (G) Mean CD9 fluorescence ($p = 0.13$, paired t -test). Panels (B–G) are representative of four independent experiments from four individual human donors.

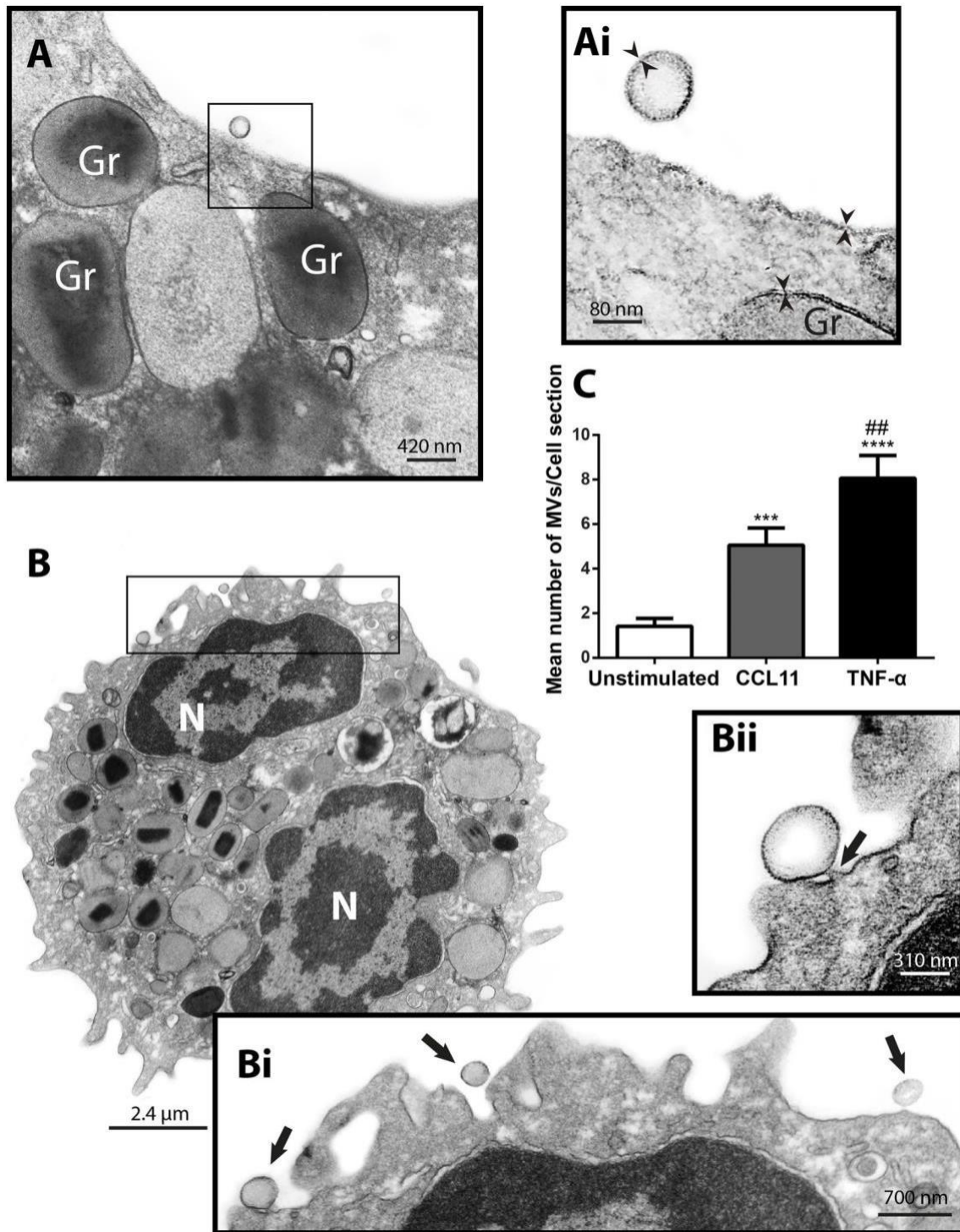


FIGURE 3 | CCL11 and TNF- α stimulation induce release of MVs by human eosinophils. (A, Ai, B, Bi, Bii) MVs are seen at the surface of both unstimulated (A) and CCL11-stimulated (B) human eosinophils. Note in high magnification (Ai) that the phospholipid bilayer membrane, which is seen by TEM as a trilaminar structure (arrowheads), is observed around the EVs, plasma membrane and secretory granule (Gr) delimiting membrane. (Bii) Shows in high magnification a MV in final process of detaching from the plasma membrane (arrow). (C) Significant increases in numbers of MVs occurred after stimulation with CCL11 or TNF- α . Eosinophils were isolated from the peripheral blood by negative selection, stimulated for 1 h, immediately fixed and processed for conventional TEM. Counts were derived from three experiments with a total of 516 MVs counted in 110 electron micrographs randomly taken and showing the entire cell profile and nucleus (N). Data represent mean \pm S.E.M. *** P < 0.002 (CCL11 vs. unstimulated); **** P < 0.0001 (TNF- α vs. unstimulated); ### P < 0.02 (TNF- α vs. CCL11).

outward budding of the plasma membrane (**Figure 3B**) and/or completely released at cell surface (**Figures 3A,B**).

To quantify the number of MVs from each experimental group, eosinophil sections showing the entire cell profile and nucleus were evaluated ($n = 110$ cells), and a total of 516 MVs were counted. Eosinophil activation led to a significant increase of MV production compared to unstimulated cells (**Figure 3C**). Quantitative EM revealed that while unstimulated cells had 1.4 ± 0.4 MVs/cell section, CCL11- and TNF- α - stimulated cells showed 5.0 ± 0.8 ($P = 0.0014$) and 8.0 ± 1.0 ($P < 0.0001$) MVs/cell section (mean \pm S.E.M), respectively (**Figure 3C**), corresponding to an increase of 360% (CCL11) and 570% (TNF- α). TNF- α induced a significant increase in the release of MVs compared to CCL11 ($P = 0.0116$; **Figure 3C**). Moreover, our quantitative analyses showed that just 50% of unstimulated cells produced MVs whereas 90 and 100% of eosinophils formed MVs in CCL11- and TNF- α -stimulated groups, respectively (**Figure 4A**). Moreover, by scoring the number of MVs, we found that in unstimulated cells, most MV-producing cells (30%), released 1–3 MVs/cell section whereas

~70% of cells produced 1–9 MVs and 4–21 MVs/cell section in response to CCL11 and TNF- α stimulation, respectively (**Figure 4B**).

Formation of MVs is a dynamic process and therefore these vesicles may be observed by TEM in different stages of budding from the plasma membrane or free at the cell surface (**Figures 3A,B, 5A**). Because our TEM studies have clearly captured this process as illustrated in **Figure 5B**, we next wondered if there was any difference in the numbers of budding/free MVs per treatment condition. Indeed, the numbers of budding MVs were significantly higher in stimulated compared to unstimulated cells [7.35 ± 0.98 for TNF- α - and 2.75 ± 0.44 for CCL11-stimulated groups vs. 0.64 ± 0.16 for unstimulated cells; MVs/cell section (mean \pm S.E.M);

$P < 0.0001$; **Figure 5C**]. Interestingly, the number of MVs in different degrees of budding was higher in TNF- α -stimulated compared to CCL11-stimulated cells (**Figure 5C**; $P < 0.0001$). Altogether, our findings reveal that two eosinophil agonist “inflammatory” stimuli induce vesiculation and that this event is more prominent in TNF- α - compared to CCL11-stimulated cells, since the number of nascent MVs was significantly higher in the TNF- α group (**Figure 5C**). Of note, the presence of MVBs was detected within eosinophils from all groups (Supplementary Figure 3). However, we did not find evidence for fusion of them with the plasma membrane and resulting exosome release (Supplementary Figure 3).

Ultrastructural Characterization of Eosinophil-Secreted MVs

In addition to quantification studies, we also established the average size of MVs to be 119.30 ± 8.61 nm (mean \pm SEM) in diameter in control cells and 140.40 ± 6.80 and 106.50 ± 6.07 (mean \pm SEM) nm in CCL11 and TNF- α , respectively (**Figure 6A**). Considering all conditions, eosinophil EV diameters varied from 20 to 1000 nm, with most MVs showing diameters between 20 and 200 nm (**Figure 6B**). MVs released in response to TNF- α were significantly smaller compared to

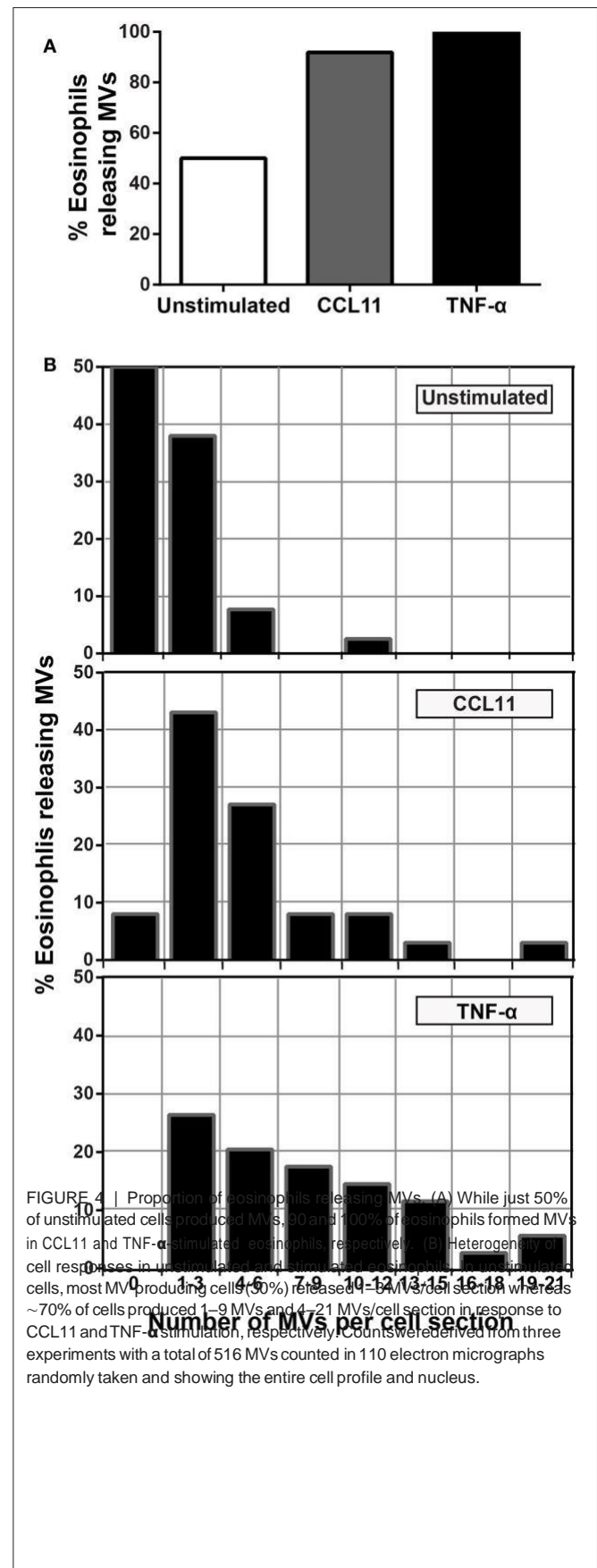


FIGURE 4 | Proportion of eosinophils releasing MVs. (A) While just 50% of unstimulated cells produced MVs, 90 and 100% of eosinophils formed MVs in CCL11 and TNF- α -stimulated eosinophils, respectively. (B) Heterogeneity of cell responses in unstimulated and stimulated eosinophils. In unstimulated cells, most MV-producing cells (30%) released 1–3 MVs/cell section whereas ~70% of cells produced 1–9 MVs and 4–21 MVs/cell section in response to CCL11 and TNF- α stimulation, respectively. Counts were derived from three experiments with a total of 516 MVs counted in 110 electron micrographs randomly taken and showing the entire cell profile and nucleus.

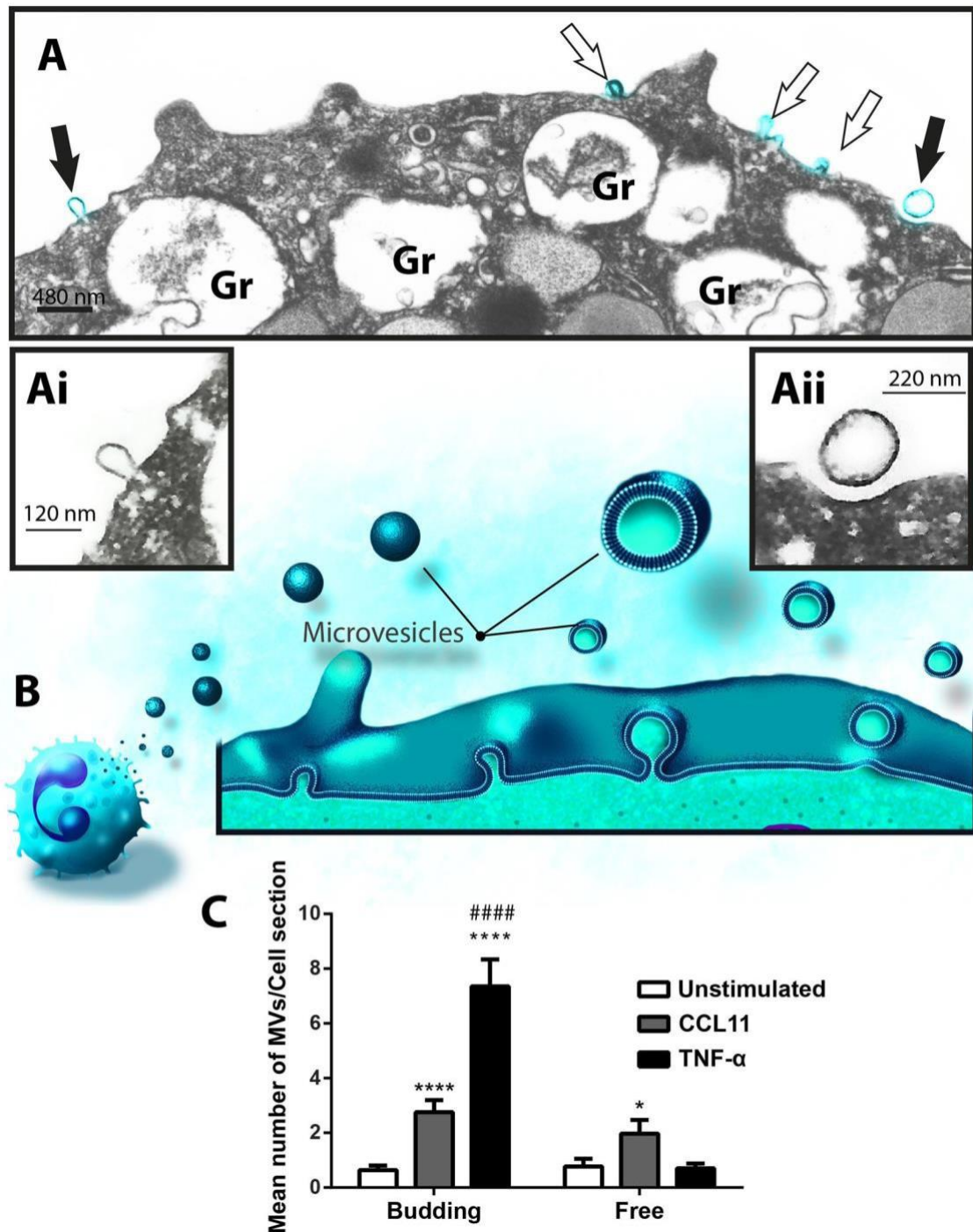


FIGURE 5 | Differential release of nascent MVs by human activated eosinophils. (A) A representative electron micrograph of a TNF- α -stimulated eosinophil shows MVs in different steps of budding at cell surface (highlighted in blue, arrows) and secretory granules (Gr) exhibiting content losses in the cytoplasm. The MVs indicated by the black arrows are seen in high magnification in (Ai) and (Aii). Note, that while (Ai) shows a MV in process of outward budding; (Aii) shows a free MV, completely detached from the plasma membrane. (B) Illustration depicting the process of MV formation in human eosinophils as observed in the present work. (C) Significant increases in numbers of budding MVs occurred after stimulation with CCL11 or TNF- α compared to unstimulated cells ($****P < 0.0001$). TNF- α elicited higher numbers of MVs in process of budding compared to the CCL11 group ($#####P < 0.0001$). Increase in numbers of free vesicles occurred after stimulation with CCL11 compared to unstimulated cells ($*P = 0.020$). Eosinophils were isolated from the peripheral blood by negative selection, stimulated for 1 h, immediately fixed in suspension and processed for conventional TEM. Counts were derived from three experiments, with a total of 516 MVs counted in 110 electron micrographs randomly taken and showing the entire cell profile and nucleus (N).

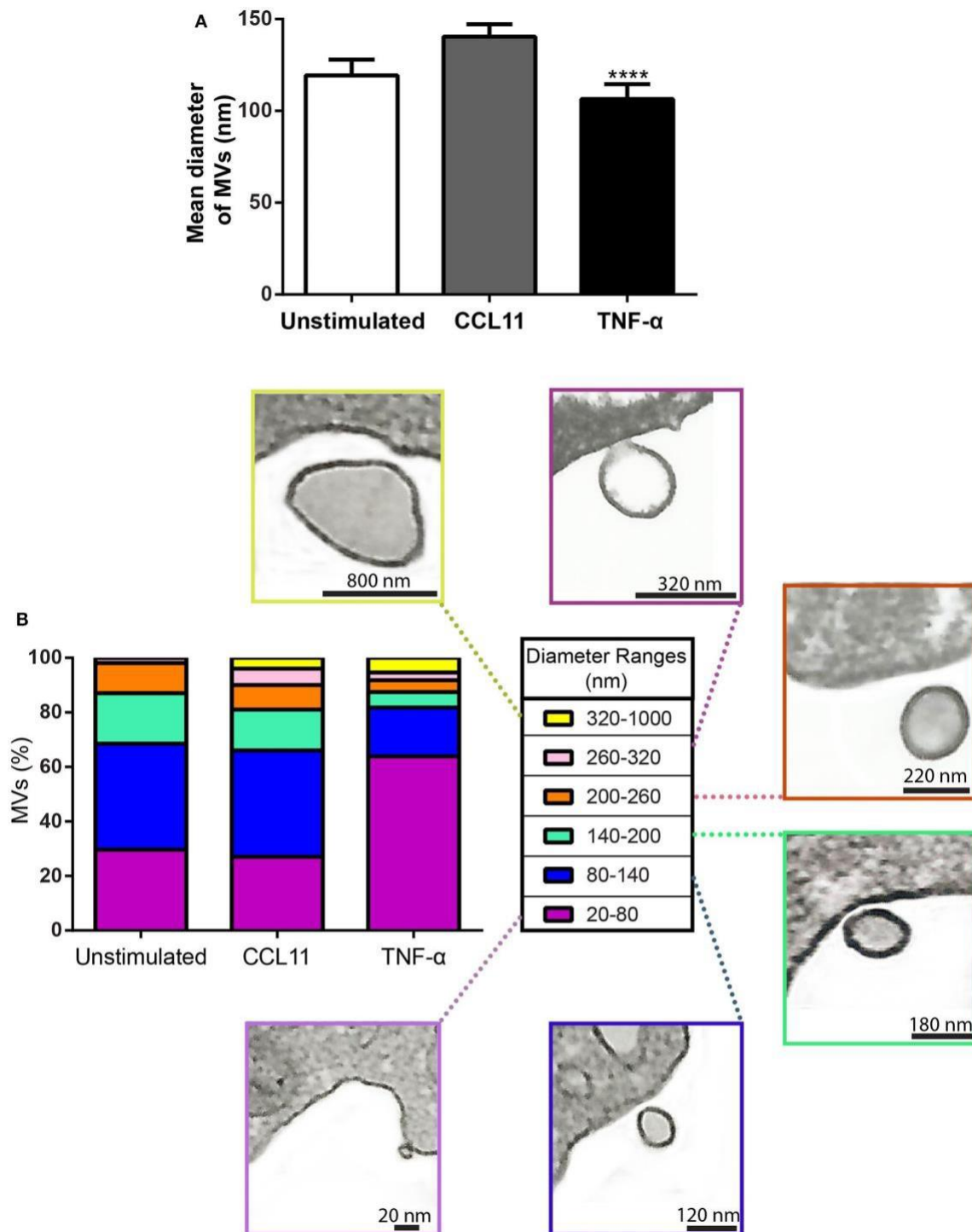


FIGURE 6 | Diameter of MVs produced by unstimulated and stimulated human eosinophils. (A) Determination of mean diameter of MVs. Significant decrease in the diameters of released MVs occurred after stimulation with TNF- α compared to both unstimulated and CCL11-stimulated groups (**** $P < 0.0001$). (B) The percentages of MVs per diameter ranges are shown. Representative electron micrographs of MVs are seen within each diameter range. Diameters of MVs were measured using *Image J software* and grouped in different ranges (20–100, 100–200, 200–300, 300–1000nm). These analyses were done in clear cross-cell sections exhibiting the entire eosinophil cell profile ($n = 110$ cells), intact plasma membranes, and nuclei.

those released after CCL11 stimulation and by unstimulated cells ($P < 0.0001$; **Figures 6A,B**).

Next, we investigated if the MVs produced by human eosinophils expressed CD63 or CD9. Ultrastructural immunolabeling for these tetraspanins were achieved with pre-embedding immunogold EM, a technique that has been used by us to ascertain precise localization of cytokines, immune cell signaling molecules and tetraspanins in leukocytes (Melo et al., 2014). In previous works, we have defined the ultrastructural pattern of immunolabeling for these tetraspanins in human eosinophils (Akuthota et al., 2012; Carmo et al., 2016). While CD63 is consistently found intracellularly in association with granules undergoing losses of their contents and large vesicular carriers (Carmo et al., 2016), pools of CD9 are more detectable at the eosinophil surface (Akuthota et al., 2012). In the present work, ultrastructural immunolabeling for CD63 and CD9 at MVs was investigated for the first time. All groups showed clear immunogold labeling for both CD63 (**Figures 7A,C**) and CD9 (**Figure 7B**). However, not all MVs were positive (see, for example **Figure 7Ci**). In both unstimulated and stimulated cells, immunolabeling for CD9 and CD63 were found in around 50 and 15% of the MVs, respectively, regardless of the stimulation condition.

Control cells, from all conditions, in which the primary antibody was omitted or replaced by an irrelevant antibody were negative (Supplementary Figure 4).

Annexin V Staining of Stimulated Human Eosinophils

It is recognized that phosphatidylserine is relocated to the outer membrane leaflet at sites on the cell surface where MV shedding occurs (reviewed in Hugel et al., 2005; Muralidharan-Chari et al., 2010). Then, we next stained eosinophils with annexin-V-FITC and samples were analyzed by both flow cytometry and confocal microscopy. Intact eosinophils were gated and their representative histogram is shown in **Figures 8A,B**, respectively. The histogram depicted unimodal distribution indicating that most cells were negatively stained by annexin-V. However, higher annexin-V intensities were observed in CCL11 and TNF- α stimulated compared to unstimulated eosinophils (**Figure 8C**). Confocal microscopy analyses showed cell surface distribution of annexin-V with suggestive images of MV formation in a population of stimulated cells (**Figure 8D**). The absence of noticeable TUNEL positive cells in CCL11 and TNF- α stimulated cells (Supplementary Figure 5) as well as by TEM indicated these are not apoptotic bodies.

DISCUSSION

The production of EVs during immune responses has increasingly been demonstrated. These vesicles released by cells from the immune system have been characterized as a new mechanism of cell-to-cell communication and emerged as potential mediators of the cell immune effects (reviewed in Buzas et al., 2014; Colombo et al., 2014; Robbins and Morelli,

2014; Greening et al., 2015). Here, we identified, for the first time, that human eosinophils release MVs in physiological conditions and that these cells respond to the chemokine CCL11 and the cytokine TNF- α stimuli with increased formation of these plasma membrane-derived vesicles. We thus recognized that, in addition to the secretory processes largely described for human eosinophils (PMD, classical exocytosis and cytolysis), these cells also have the competence to secrete MVs and that these vesicles likely underlie eosinophil immune responses.

The cell biology of EVs is still poorly understood. To comprehend the origin of the different populations of these secreted membrane-bound vesicles and their functional significance, a better knowledge of their mechanisms of biogenesis and secretion is still needed (Colombo et al., 2014). Here we provided a comprehensive evaluation of EVs secreted by human eosinophils using TEM, which is considered the gold standard for EV visualization (Lawson et al., 2016). Our present work highlights important aspects to the maturing field of EV research. First, it is clear that EVs cannot be defined on the basis of their size range as exosomes or MVs since these classes of EVs have overlapping sizes. In general, exosomes are considered to be smaller (~50–100 nm) than MVs (reviewed in van der Pol et al., 2012; Lawson et al., 2016), but we found that MVs from eosinophils can be as small as 20 nm (range of 20–1000 nm), with most MVs measuring 20–200 nm. In the literature, MVs have been reported as a heterogeneous population in size up to 2000 nm (reviewed in Buzas et al., 2014; Schwab et al., 2015; Lawson et al., 2016). Because our electron microscopic analyses were done on a population of MVs clearly seen at cell surface (nascent MVs), when the cells were still in suspension, we believe that the observed diameter range is more precise than those established on isolated vesicles. Indeed, because of the small size of MVs, a considerable portion of them may be below the detection range of conventional detection methods (van der Pol et al., 2012). Moreover, mechanical disruption of the cells/tissues can interfere with the EV purity, since intracellular vesicles might also be isolated during the process (Lötvall et al., 2014). This is particularly concerning for human eosinophils, which have a well-characterized intracellular morphologically distinct vesicular system termed eosinophil sombrero vesicles (EoSvs; 150–300 nm diameter) that can be isolated and maintain their integrity even after cell cytolysis (Melo et al., 2005b, 2008b, 2009; Saffari et al., 2014). Second, our findings demonstrate, for the first time, that, depending on the influence of external factors/stimuli, the sizes of MVs can vary (**Figure 6**). Thus, MVs released from TNF- α -stimulated eosinophils exhibited smaller size compared to CCL11-stimulated cells (**Figure 6**). This might be explained by the rapid production of these membranous structures after stimulation, which may be affecting membrane replenishment and dynamics required for vesicle formation.

The present work also raises discussion on an important

point of the EV biology: the use of appropriate markers for EVs released by non-immune and immune cells. In general, the tetraspanins CD63 and CD9 have been proposed as “universal” EV markers and exosomes have been described

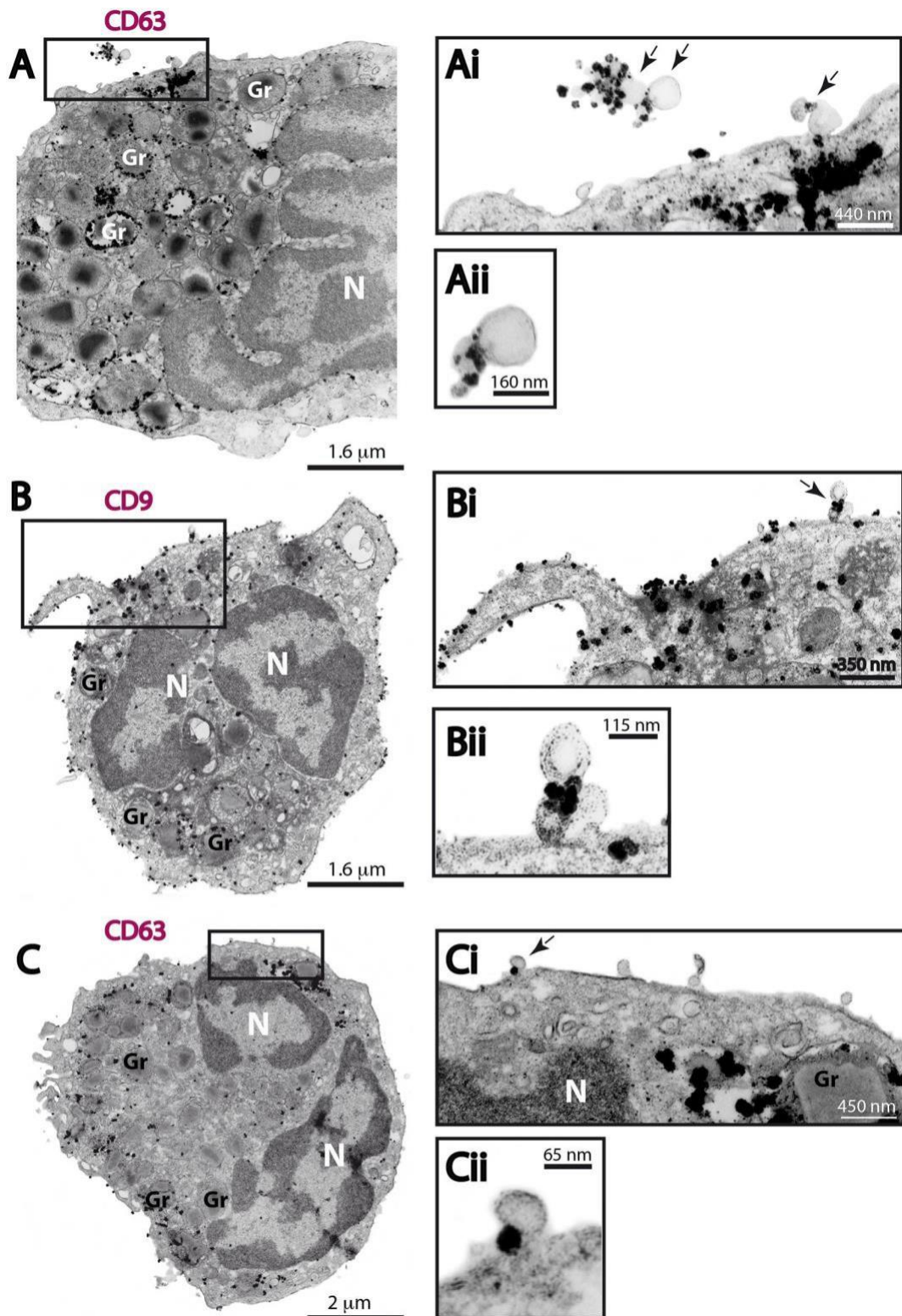


FIGURE 7 | CD63 and CD9 immunolabeling of MVs by immunonogold EM. (A–C) Representative electron micrographs of stimulated human eosinophils showing the entire cell profile after CD63 (A,C) or CD9 (B) immunolabeling. Note that while CD63 is consistently found intracellularly in association with secretory granules (Gr) as seen in (A) and (C), pools of CD9 are more detectable at the eosinophil surface as observed in (B). (Ai, Aii, Bi, Bii, Ci, Cii) CD63 and CD9-positive MVs (arrows) are seen in higher magnification in the boxed areas. Note, that not all MVs were labeled. Eosinophils were isolated from the peripheral blood by negative selection, stimulated for 1 h with CCL11 (A,B) or TNF- α (C), immediately fixed in suspension and processed for immunonogold EM.

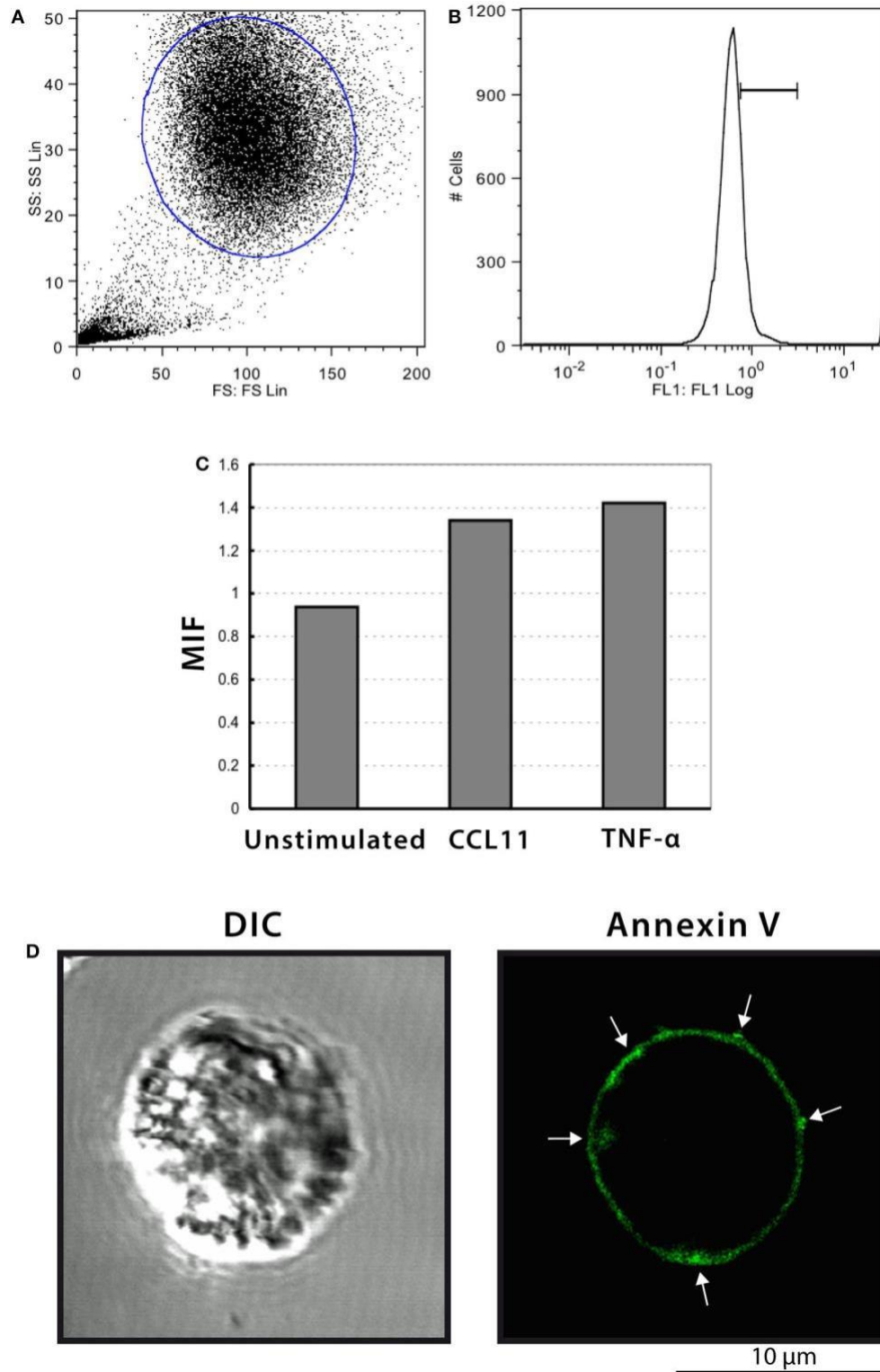


FIGURE 8 | Annexin-V staining of human eosinophils. (A–C) Flow cytometric analyses show higher annexin-V intensities in CCL11 and TNF- α -stimulated compared to unstimulated cells. (D) Representative confocal microscopic image from a CCL11-stimulated eosinophil reveal cell surface distribution of annexin-V. Arrows indicate suggestive images of MV formation. Eosinophils were isolated from the peripheral blood by negative selection, stimulated for 1 h with CCL11 or TNF- α and stained with annexin-V.

as highly enriched in these molecules (reviewed in Andreu and Yáñez-Mó, 2014). However, the presence of CD63 and CD9 in plasma membrane-derived MVs has been much less studied, regardless of cell type. Few studies have currently assumed that MVs express tetraspanins (Crescitelli et al., 2013). Here, we provide direct evidence for both CD63 and CD9 localization on MVs secreted by human eosinophils (Figure 7). Our immunogold EM findings clearly showed CD63 and CD9 labeling associated with the delimiting membrane of MVs (Figure 7). However, in accord with our nanoscale flow cytometry results (Figure 2), immunoEM also revealed that not all MVs were labeled (see, for example, Figure 7Ci), with ~50 and ~15% of these vesicles labeled for CD9 and CD63,

respectively, regardless of whether cells were stimulated or not. CD63 was not detected by flow cytometry, possibly because of the very small size and/or low proportion of this CD63-positive EV population. Therefore, CD9, a tetraspanin largely found at the surface of human eosinophils (Akuthota et al., 2012) might be a better marker than CD63 for MVs released by human eosinophils.

At first view it seems unexpected to have undetectable levels (as observed by flow cytometry) or low labeling (as seen by immunoEM) for CD63 on MVs. However, we have demonstrated in a recent study by different approaches that while CD63 is observed at the eosinophil's cell surface after stimulation with both CCL11 and TNF- α , a robust pool of CD63 remains in the cytoplasm in association with secretory granules and EoSVs, with no detectable difference in the CD63 total content when unstimulated and stimulated cells were compared (Carmo et al., 2016). This means that CD63 is present, as a preformed pool within eosinophils and that most of this internal CD63 pool is not completely externalized in response to stimulation (Carmo et al., 2016). Accordingly, a small proportion of secreted MVs showed immunolabeling for this tetraspanin. Moreover, our comprehensive EM analyses demonstrated that eosinophils release MVs and not typical exosomes in response to stimulation with CCL11 or TNF- α . Although MVs were observed in the eosinophil cytoplasm during the present EM analyses, there was no ultrastructural evidence for exosome secretion. Our data are in part in accord with a work showing that stimulation of human eosinophils with CCL11 does not appear to increase secretion of CD63-positive exosomes (Mazzeo et al., 2015). On the other hand, these authors found that stimulation with interferon-gamma (INF- γ) induced exosome secretion by these cells (Mazzeo et al., 2015).

Here, induction of EV release was achieved with TNF- α and

CCL11. TNF- α is a potent cytokine that mediates inflammatory responses and innate immunity (reviewed in Sabio and Davis, 2014). Stimulation of human eosinophils with TNF- α induces secretion of IL-4, IL-6 and INF- γ (Spencer et al., 2009). TNF- α is also central for INF- γ -induced secretion of Th1-type chemokines and to enhance IL-4-induced secretion of Th2-type chemokines by human eosinophils (Liu et al., 2007). We recently demonstrated that this stimulus leads to a secretory process characterized by fusion of eosinophil secretory granules (classical exocytosis) and extensive release of granule contents

while CCL11 elicits a progressive and more subtle release of specific products stored in secretory granules (piecemeal degranulation; Carmo et al., 2016). For example, CCL11 stimulation of human eosinophils elicits specific release of IL-4 (Bandeira-Melo et al., 2001). Our present data showed that the differential secretory/immune responses induced by these two stimuli trigger differential rates of EV release. Higher numbers of MVs were detected in eosinophils in response to TNF- α compared to CCL11 stimulation. Thus, MVs released by human eosinophils may potentially carry different cargos and mediate different effects on other cells, depending on the stimulus/pathological condition. We can speculate that eosinophil MVs might be acting as potential mediators of immune responses. The release of them at inflammatory sites in tissues and/or in biological fluids, including peripheral blood, may enable *in situ* and/or long-distance transfer of bioactive molecules such as cytokines. These molecules may influence target cells by activating cell receptors with vital roles in inflammation. In fact, the implication of MVs in inflammation has been documented. For example, the presence of interleukin-1 β was detected in MVs shedding from the plasma membrane of activated monocytes (MacKenzie et al., 2001). However, the identification of molecular cargos within these eosinophil-released MVs awaits further investigation to get insights into their functional roles.

Taken together, our findings identify, for the first time, that human eosinophils secrete MVs during physiological conditions and that the release of these vesicles is increased in response to both CCL11 and TNF- α . Given the potential of EVs as mediators of immune responses, our results open new venues to understand how these vesicles function to regulate eosinophil-mediated immunity and if they can be used as biomarkers for eosinophil-associated disorders.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RCNM and PA provided the study conception and design. RCNM, PA, and PW provided study guidance, mentorship, and critical editing of the manuscript. LC, KB, ROM, TS, JG, KC, SU, RCNM performed experiments, acquired, and analyzed the data. PA, IG, LC, KB, TS, JG, SU, PW, RCNM interpreted data. VT, JT, VC, and SU performed flow cytometric analyses. RCNM and PA prepared the manuscript. All authors contributed in part to writing and editing the manuscript and approved the final version.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by National Institutes of Health (NIH grants, USA-R37AI020241, R01AI022571, R01HL095699, K08HL116429) and by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil-477475/2013-2; 469995/2014-9, 311083/2014-5), Brazilian Ministry of Health and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil-CBB-APQ-02239-14), and the American Partnership for Eosinophilic

Disorders (HOPE Pilot). We gratefully acknowledge the skillful assistance of Ellen Morgan (Electron Microscopy Unit, Department of Pathology, BIDMC, Harvard Medical School) and Centro de Microscopia (UFMG, Brazil) for the use of its facility.

REFERENCES

Akuthota, P., Capron, K., and Weller, P. F. (2014). Eosinophil purification from peripheral blood. *Methods Mol. Biol.* 1178, 13–20. doi: 10.1007/978-1-4939-1016-8_2

Akuthota, P., Melo, R. C. N., Spencer, L. A., and Weller, P. F. (2012). MHC Class II and CD9 in human eosinophils localize to detergent-resistant membrane microdomains. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46, 188–195. doi: 10.1165/rcmb.2010-0335OC

Andreu, Z., and Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front. Immunol.* 5:442. doi: 10.3389/fimmu.2014.00442

Bandeira-Melo, C., Gillard, G., Ghiran, I., and Weller, P. F. (2000). EliCell: a gel-phase dual antibody capture and detection assay to measure cytokine release from eosinophils. *J. Immunol. Methods* 244, 105–115. doi: 10.1016/S0022-1759(00)00264-7

Bandeira-Melo, C., Perez, S. A., Melo, R. C. N., Ghiran, I., and Weller, P. F. (2003). EliCell assay for the detection of released cytokines from eosinophils. *J. Immunol. Methods* 276, 227–237. doi: 10.1016/S0022-1759(03)00076-0

Bandeira-Melo, C., Sugiyama, K., Woods, L. J., and Weller, P. F. (2001). Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J. Immunol.* 166, 4813–4817. doi: 10.4049/jimmunol.166.8.4813

Buzás, E. I., György, B., Nagy, G., Falus, A., and Gay, S. (2014). Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 356–364. doi: 10.1038/nrrheum.2014.19

Carmo, L. A. S., Bonjour, K., Ueki, S., Neves, J. S., Liu, L., Spencer, L. A., et al. (2016). CD63 is tightly associated with intracellular, secretory events chaperoning piecemeal degranulation and compound exocytosis in human eosinophils. *J. Leukoc. Biol.* 100, 391–401. doi: 10.1189/jlb.3A1015-480R

Carmo, L. A. S., Dias, F. F., Malta, K. K., Amaral, K. B., Shamri, R., Weller, P. F., et al. (2015). Expression and subcellular localization of the Qa-SNARE syntaxin17 in human eosinophils. *Exp. Cell Res.* 337, 129–135. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.07.003

Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326

Crescitelli, R., Lässer, C., Szabó, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., et al. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J. Extracell. Vesicles* 2, doi: 10.3402/jev.v2i0.20677

Danielson, K. M., Estanislau, J., Tigges, J., Toxavidis, V., Camacho, V., Felton, E. J., et al. (2016). Diurnal variations of circulating extracellular vesicles measured by nano flow cytometry. *PLoS ONE* 11:e0144678. doi: 10.1371/journal.pone.0144678

Dias, F. F., Amaral, K. B., Carmo, L. A. S., Shamri, R., Dvorak, A. M., Weller, P. F., et al. (2014). Human eosinophil leukocytes express protein disulfide isomerase in secretory granules and vesicles: ultrastructural studies. *J. Histochem. Cytochem.* 62, 450–459. doi: 10.1369/0022155414531437

Egesten, A., Blom, M., Calafat, J., Janssen, H., and Knol, E. F. (1998). Eosinophil granulocyte interaction with serum-opsonized particles: binding and degranulation are enhanced by tumor necrosis factor alpha. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 115, 121–128. doi: 10.1159/000023891

González-Cano, P., Mondragón-Flores, R., Sánchez-Torres, L. E., González-Pozos, S., Silva-Miranda, M., Monroy-Ostria, A., et al. (2010). Mycobacterium tuberculosis H37Rv induces ectosome release in human polymorphonuclear neutrophils. *Tuberculosis (Edinb.)* 90, 125–134. doi: 10.1016/j.tube.2010.01.002

Greening, D. W., Gopal, S. K., Xu, R., Simpson, R. J., and Chen, W. (2015). Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 40, 72–81. doi: 10.1016/j.semdcb.2015.02.009

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2016.00117/full#supplementary-material>

Hugel, B., Martínez, M. C., Kunzelmann, C., and Freyssinet, J. M. (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology* 20, 22–27. doi: 10.1152/physiol.00029.2004

Lawson, C., Vicencio, J. M., Yellon, D. M., and Davidson, S. M. (2016). Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *J. Endocrinol.* 228, R57–R71. doi: 10.1530/JOE-15-0201

Liu, L. Y., Bates, M. E., Jarjour, N. N., Busse, W. W., Bertics, P. J., and Kelly, E. A. (2007). Generation of Th1 and Th2 chemokines by human eosinophils: evidence for a critical role of TNF-alpha. *J. Immunol.* 179, 4840–4848. doi: 10.4049/jimmunol.179.7.4840

Lotvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., et al. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 3:26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913

MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., and Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 15, 825–835. doi: 10.1016/S1074-7613(01)00229-1

Mazzeo, C., Cañas, J. A., Zafra, M. P., Rojas Marco, A., Fernández-Nieto, M., Sanz, V., et al. (2015). Exosome secretion by eosinophils: a possible role in asthma pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 1603–1613. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.026

Melo, R. C. N., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2008a). Electron tomography and immunogold electron microscopy for investigating intracellular trafficking and secretion in human eosinophils. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1416–1419. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00346.x

Melo, R. C. N., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2010). Contributions of electron microscopy to understand secretion of immune mediators by human eosinophils. *Microsc. Microanal.* 16, 653–660. doi: 10.1017/S1431927610093864

Melo, R. C. N., Liu, L., Xenakis, J. J., and Spencer, L. A. (2013a). Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. *Allergy* 68, 274–284. doi: 10.1111/all.12103

Melo, R. C. N., Morgan, E., Monahan-Earley, R., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2014). Pre-embedding immunogold labeling to optimize protein localization at subcellular compartments and membrane microdomains of leukocytes. *Nat. Protoc.* 9, 2382–2394. doi: 10.1038/nprot.2014.163

Melo, R. C. N., Paganoti, G. F., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2013b). The internal architecture of leukocyte lipid body organelles captured by three-dimensional electron microscopy tomography. *PLoS ONE* 8:e59578. doi: 10.1371/journal.pone.0059578

Melo, R. C. N., Perez, S. A., Spencer, L. A., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2005a). Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. *Traffic* 6, 866–879. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00322.x

Melo, R. C. N., Spencer, L. A., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2008b). Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *J. Leukoc. Biol.* 83, 229–236. doi: 10.1189/jlb.0707503

Melo, R. C. N., Spencer, L. A., Perez, S. A., Ghiran, I., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2005b). Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. *Traffic* 6, 1047–1057. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00344.x

Melo, R. C. N., Spencer, L. A., Perez, S. A., Neves, J. S., Bafford, S. P., Morgan, E. S., et al. (2009). Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. *Lab. Invest.* 89, 769–781. doi: 10.1038/labinvest.2009.40

Melo, R. C. N., and Weller, P. F. (2010). Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histol. Histopathol.* 25, 1341–1354. doi: 10.14670/HH-25.1341

- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A., and D'Souza-Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J. Cell Sci.* 123, 1603–1611. doi: 10.1242/jcs.064386
- Robbins, P. D., and Morelli, A. E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 195–208. doi: 10.1038/nri3622
- Sabio, G., and Davis, R. J. (2014). TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin. Immunol.* 26, 237–245. doi: 10.1016/j.smim.2014.02.009
- Saffari, H., Hoffman, L. H., Peterson, K. A., Fang, J. C., Leiferman, K. M., Pease, L. F. III, et al. (2014). Electron microscopy elucidates eosinophil degranulation patterns in patients with eosinophilic esophagitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 1728 e1721–1734 e1721. doi: 10.1016/j.jaci.2013.11.024
- Schwab, A., Meyering, S. S., Lepene, B., Iordanskiy, S., Van Hoek, M. L., Hakami, R. M., et al. (2015). Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis. *Front. Microbiol.* 6:1132. doi: 10.3389/fmicb.2015.01132
- Spencer, L. A., Bonjour, K., Melo, R. C. N., and Weller, P. F. (2014). Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. *Front. Immunol.* 5:496. doi: 10.3389/fimmu.2014.00496
- Spencer, L. A., Melo, R. C. N., Perez, S. A., Bafford, S. P., Dvorak, A. M., and Weller, P. F. (2006). Cytokine receptor-mediated trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3333–3338. doi: 10.1073/pnas.0508946103
- Spencer, L. A., Szela, C. T., Perez, S. A., Kirchhoffer, C. L., Neves, J. S., Radke, A. L., et al. (2009). Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J. Leukoc. Biol.* 85, 117–123. doi: 10.1189/jlb.0108058
- Twu, O., and Johnson, P. J. (2014). Parasite extracellular vesicles: mediators of intercellular communication. *PLoS Pathog.* 10:e1004289. doi: 10.1371/journal.ppat.1004289
- van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev.* 64, 676–705. doi: 10.1124/pr.112.005983

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

The reviewer MP and handling Editor declared their shared affiliation, and the handling Editor states that the process nevertheless met the standards of a fair and objective review.

Copyright © 2016 Akuthota, Carmo, Bonjour, Murphy, Silva, Gamalier, Capron, Tigges, Toxavidis, Camacho, Ghiran, Ueki, Weller and Melo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CD63 is tightly associated with intracellular, secretory events chaperoning piecemeal degranulation and compound exocytosis in human eosinophils

Lívia A. S. Carmo,* Kennedy Bonjour,* Shigeharu Ueki,[†] Josiane S. Neves,[‡] Linying Liu,[§] Lisa A. Spencer,[§] Ann M. Dvorak,[‡] Peter F. Weller,[§] and Rossana C. N. Melo*^{§,1}

*Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, ICB, Federal University of Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, Brazil;

[†]Department of General Internal Medicine and Clinical Laboratory Medicine, Akita University Graduate School of Medicine, Akita,

Japan; [‡]Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; and Departments of [§]Medicine

and [‡]Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

RECEIVED OCTOBER 22, 2015; REVISED JANUARY 18, 2016; ACCEPTED FEBRUARY 2, 2016. DOI: 10.1189/jlb.3A1015-480R

ABSTRACT

Eosinophil activation leads to secretion of presynthesized, granule-stored mediators that determine the course of allergic, inflammatory, and immunoregulatory responses. CD63, a member of the transmembrane-4 glycoprotein superfamily (tetraspanins) and present on the limiting membranes of eosinophil-specific (secretory) granules, is considered a potential surface marker for eosinophil degranulation. However, the intracellular secretory trafficking of CD63 in eosinophils and other leukocytes is not understood. Here, we provide a comprehensive investigation of CD63 trafficking at high resolution within human eosinophils stimulated with inflammatory stimuli, CCL11 and tumor necrosis factor α , which induce distinctly differing secretory processes in eosinophils: piecemeal degranulation and compound exocytosis, respectively. By using different transmission electron microscopy approaches, including an immunonanogold technique, for enhanced detection of CD63 at subcellular compartments, we identified a major intracellular pool of CD63 that is directly linked to eosinophil degranulation events. Transmission electron microscopy quantitative analyses demonstrated that, in response to stimulation, CD63 is concentrated within granules undergoing secretion by piecemeal degranulation or compound exocytosis and that CD63 tracks with the movements of vesicles and granules in the cytoplasm. Although CD63 was observed at the cell surface after stimulation, immunonanogold electron microscopy revealed that a strong CD63 pool remains in the cytoplasm. It is remarkable that CCL11 and tumor necrosis factor α triggered increased formation of CD63⁺ large vesiculotubular carriers (eosinophil sombrero vesicles),

which fused with granules in the process of secretion, likely acting in the intracellular translocation of CD63. Altogether, we identified active, intracellular CD63 trafficking connected to eosinophil granule-derived secretory pathways. This is important for understanding the complex secretory activities of eosinophils underlying immune responses. *J. Leukoc. Biol.* 100: 391–401; 2016.

Introduction

A key function of immune cells is to secrete a diversity of cytokines and other mediators that determine the course of allergic, inflammatory, and immunoregulatory responses. Thus, it is increasingly important to understand how these mediators are trafficked and secreted. The intracellular secretory compartments and the regulatory machinery that command the timing, volume, and direction of mediator release are all crucial to the coordinated delivery of these messengers (reviewed in Stow et al. [1]).

Eosinophils, leukocytes of the innate immune system, are able to release numerous mediators from their specific (secretory) granules, the major granule population in the cytoplasm of these cells. Hydrolytic enzymes; distinct, cationic proteins, including major basic protein, eosinophil peroxidase, and the eosinophil-associated RNases: eosinophil-derived neurotoxin and eosinophilic cationic protein; and ~3 dozen cytokines with multiple functional activities are pre-synthesized and stored within these intracellular granules, poised for very rapid, stimulus-induced secretion (reviewed in Spencer et al. [2]). Eosinophil-specific granules, also termed secondary or crystalline granules, have a unique morphology, unambiguously identified by TEM and, for this reason, are

Abbreviations: EM = electron microscopy, EoSV = eosinophil sombrero vesicle, PFA = paraformaldehyde, PMD = piecemeal degranulation, TEM = transmission electron microscopy

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

1. Correspondence: Laboratory of Cellular Biology, Federal University of Juiz de Fora, UFJF, Rua José Lourenço Kelmer, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil. E-mail: rossana.melo@ufjf.edu.br

both a morphologic hallmark of eosinophils and fundamental to eosinophil-mediated responses (reviewed in Melo et al. [3]).

Structural changes of eosinophil-specific granules are revealing in demonstrating the complex and diverse secretory activities of this cell. Fusion of a population of specific granules with each other, thus creating large, open channels for granule cargo release, characterizes a secretory process termed compound exocytosis, which is reported during the interaction of eosinophils with different parasitic helminths [4]. This pattern of secretion is also observed during the innate response by eosinophils to certain environmental fungi [5].

The identification of emptying granules with reduced electron density and disassembled contents, in the absence of granule fusions, is a feature of PMD, a secretory process frequently used by human eosinophils in a diversity of inflammatory and allergic disorders, such as asthma [6], nasal polyposis [7], allergic rhinitis [7, 8], ulcerative colitis [7], Crohn disease [7], atopic dermatitis [9], gastric carcinoma [10], shigellosis [11], and cholera [12]. In this form of secretion, human eosinophils secrete the granule matrix or the core contents or both but retain their granule containers. PMD results in a cell filled with partially empty, or fully empty, secretory granules. In contrast to compound exocytosis, whereby entire granule contents are extruded in toto, PMD enables extracellular delivery of specific mediators through transport vesicles, including large vesiculo-tubular carriers, termed EoSvSs, which bud off from the granules to ferry their contents to the plasma membrane for release (reviewed in Melo and Weller [13]). In vitro, PMD follows stimulation with inflammatory mediators, such as the C–C chemokines CCL11 (eotaxin-1) and CCL5 (RANTES) and platelet-activating factor [14, 15].

CD63, a member of the transmembrane-4 glycoprotein superfamily (tetraspanins) (reviewed in Pols and Klumperman [16]), is present on the limiting, surface membranes of eosinophil-specific granules [15, 17–19]. CD63 is also found in secretory granules of other cells from the immune system, such as human neutrophils and basophils, and constitutes a well-established component of late endosomal and lysosomal membranes [16].

Although CD63 is associated with cell secretion and used as a surface marker for degranulation in several types of leukocytes [5, 20–22], the trafficking and function of CD63 in eosinophils remain to be established. In the present work, we address the distribution and intracellular trafficking of CD63 within human eosinophils stimulated with inflammatory stimuli, which are known to induce eosinophil activation and secretion: CCL11 and TNF- α [23–27]. By using different TEM approaches, including an immunogold technique, for superior detection of CD63 at subcellular compartments and membrane microdomains [28], we provide the first characterization, to our knowledge, of intracellular, CD63-linked secretory processes at high resolution in eosinophils from the innate immune system. We demonstrate that CD63 is concentrated on eosinophil granules actively participating in degranulation events and in transport carriers and that this tetraspanin traffics in the eosinophil cytoplasm, chaperoning both compound exocytosis and PMD.

MATERIALS AND METHODS

Eosinophil isolation, stimulation, and viability

Granulocytes were isolated from peripheral blood of allergic or healthy donors. Eosinophils were enriched and purified by negative selection with a human eosinophil-enrichment cocktail (StemSep, StemCell Technologies, Tukwila, WA, USA) and the MACS bead procedure (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), as previously described [29], with the exception that hypotonic RBC lysis was omitted to avoid any potential for RBC lysis to affect eosinophil function. Eosinophil viability and purity were $\geq 99\%$, as determined by ethidium bromide (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) incorporation and cyto-centrifuged smears stained with HEMA 3 stain kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), respectively. Experiments were approved by the Beth Israel Deaconess Medical Center, Committee on Clinical Investigation, and informed consent was obtained from all subjects. Purified eosinophils (10^6 cells/ml) were stimulated with TNF- α (200 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or recombinant human CCL11 (100 ng/ml; R&D Systems), in RPMI-1640 medium plus 0.1% ovalbumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or medium alone at 37°C, for 1 h. At these concentrations, CCL11 induces PMD [14] and TNF- α induces fusion of specific granules [30].

Antibody reagents

Mouse anti-human IgG₁ CD63 (clone H5C6, catalog no. 556019) and irrelevant isotype-control mAbs (BDPharMingen, BDBiosciences, San Diego, CA, USA) were used for Western blotting (2 mg/ml), fluorescence microscopy (7.5 mg/ml), and electron microscopy (5 mg/ml) immunodetection studies. Rabbit anti-human CD63 (0.25 mg/ml) (System Biosciences, Mountain View, CA, USA) or rabbit anti-human GAPDH (0.2 mg/ml) (Sigma-Aldrich) were additionally used for Western blotting. Secondary antibodies for Western blotting were anti-mouse IgG HRP-conjugated Ab (1:5000, Amersham ECL, GE Healthcare Life Sciences, Township, NJ, USA) or anti-rabbit IgG HRP-conjugated Ab (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and, for immunofluorescence, was an anti-mouse IgG Ab conjugated to Alexa Fluor 488 (1:100; Molecular Probes). The secondary Ab for immuno-EM was an affinity-purified goat anti-mouse Fab fragment conjugated to 1.4-nm gold particles (1:100, Nanogold; Nanoprobes, Stony Brook, NY, USA).

Immunofluorescence microscopy

Human eosinophils were resuspended in 0.1% BSA RPMI-1640 medium (1×10^6 cells/ml) and stimulated, as above, in FBS-coated (coating: 10% FBS-PBS [0.02 M PBS = 0.15 M NaCl], 2 h at 37°C), 96-well plates (each, 0.2×10^6 cells/well) at 37°C in 5% CO₂ incubator. Cells were removed to prewarmed Lab-Tek II CC chamber slides (Nalge Nunc, Rochester, NY, USA), incubated for 5 min to adhere to the plate, and fixed with 3.7% PFA for 10 min at room temperature. Nonpermeabilized cells were incubated with mouse anti-human CD63 or isotype control Ab overnight at 4°C, washed, and incubated with secondary Ab at room temperature. Cells were imaged with a BX62 Olympus upright microscope (Olympus, Tokyo, Japan), 3100 objective, coupled to a QImaging Retiga EXi-cooled digital camera (Qimaging, Surrey, BC, Canada), and images acquired using iVision (BioVision Technologies, Exton, PA, USA).

Western blotting

Purified eosinophils (2×10^6 cells/ml) were stimulated for 1 h in the presence or absence of TNF- α (200 ng/ml) or recombinant human CCL11 (100 ng/ml), and cell lysates (25×10^6 /ml) were prepared in radio-immunoprecipitation assay buffer (Boston BioProducts, Ashland, MA, USA) with protease inhibitor cocktail (1:1000; Sigma-Aldrich). Denatured samples were run on 4–15% Mini-Protean TGX precast gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and blocked for 1 h with 5% milk/TBST before probing with the primary Abs overnight at 4°C, followed by secondary Abs for 1 h at room temperature. Membranes were developed with Super Signal West Femto substrate (Thermo

Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) per the manufacturer's instructions. Signal bands were visualized using a camera and Bio-Rad Image Lab Software.

Conventional TEM

For conventional TEM, isolated eosinophils were prepared as before [14, 15]. Cells were fixed in a mixture of freshly prepared aldehydes (1% PFA and 1.25% glutaraldehyde) in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h at room temperature, embedded in 2% agar, and kept at 4°C for further processing. Agar pellets containing eosinophils were postfixed in 1% osmium tetroxide in sym-collidine buffer, pH 7.4, for 2 h at room temperature. After washing with sodium maleate buffer, pH 5.2, pellets were stained en bloc in 2% uranyl acetate in 0.05 M sodium maleate buffer, pH 6.0, for 2 h at room temperature and washed in the same buffer used previously before dehydration in graded ethanols and infiltration and embedding with a propylene oxide-Epon sequence (Eponate 12 Resin; Ted Pella, Redding, CA, USA). Alternatively, samples were postfixed in 2% aqueous osmium tetroxide and 1.5% potassium ferrocyanide in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.0 (reduced osmium), before dehydration and embedding as above. After polymerization at 60°C for 16 h, thin sections were cut using a diamond knife on an ultramicrotome (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA). Sections were mounted on uncoated, 200-mesh, copper grids (Ted Pella) before staining with lead citrate and viewed with a transmission electron microscope (CM 10; Philips Research, Eindhoven, The Netherlands) at 60 kV.

Cell preparation for immunonogold EM

For immuno-EM, purified eosinophils were immediately fixed in fresh 4% PFA in PBS, pH 7.4 [28]. Cells were fixed for 30 min at room temperature, washed in PBS, and centrifuged at 1500 *g* for 1 min. Samples were then resuspended in molten 2% agar in PBS and quickly recentrifuged. Pellets were immersed in 30% sucrose in PBS overnight at 4°C, embedded in OCT compound (Miles Laboratories, Elkhart, IN, USA), and stored in 2180°C liquid nitrogen for subsequent use.

Pre-embedding immunonogold EM

As detailed before [15, 31, 32], pre-embedding immunolabeling was performed before standard EM processing (postfixation, dehydration, infiltration, resin embedding, and resin sectioning). All labeling steps were carried out at room temperature as before [28] as follows: 1) 1 wash in 0.02 M PBS, pH 7.6, 5 min; 2) immersion in 50 mM glycine in 0.02 M PBS, pH 7.4, 10 min; 3) incubation in a mixture of PBS and BSA (PBS-BSA buffer; 0.02 M PBS plus 1% BSA) containing 0.1% gelatin (20 min), followed by PBS-BSA plus 10% normal goat serum (30 min)—(this step is crucial to block nonspecific Ab binding sites); 4) incubation with primary Ab (1 h); 5) blocking with PBS-BSA plus normal goat serum (30 min); 6) incubation with secondary Ab (1 h); 7) washing in PBS-BSA (3 times of 5 min each); 8) postfixation in 1% glutaraldehyde (10 min); 9) 5 washings in distilled water; 10) incubation with HQ silver enhancement solution in a darkroom according to the manufacturer's instructions (Nanoprobes) (10 min) (this last step enables nucleation of the silver ions around the gold particles, and these ions precipitate as silver metal, and the particles grow in size, facilitating observation under TEM); 11) 3 washings in distilled water; 12) immersion in freshly prepared 5% sodium thiosulfate (5 min); 13) postfixation with 1% osmium tetroxide in distilled water (10 min); 14) staining with 2% uranyl acetate in distilled water (5 min); 15) embedding in Eponate (Eponate 12 Resin; Ted Pella); 16) after polymerization at 60°C for 16 h, embedding was performed by inverting eponate-filled plastic capsules over the slide-attached tissue sections; and 17) separation of eponate blocks from glass slides by brief immersion in liquid nitrogen. Thin sections were cut using a diamond knife on an ultramicrotome (Leica). Sections were mounted on uncoated, 200-mesh, copper grids (Ted Pella) before staining with lead citrate and viewing with a transmission electron microscope (CM 10; Philips) at 60 kV. Two controls were performed: 1) primary Ab was replaced by an irrelevant Ab, and 2) primary Ab was omitted. Electron micrographs were randomly taken at different magnifications to study the entire cell profile and subcellular features.

Quantitative EM analysis

For quantification studies by conventional TEM (enumeration of the total number of specific granules undergoing morphologic changes of PMD or exocytosis in stimulated and unstimulated cells), we randomly took electron micrographs of cell sections showing the entire eosinophil cell profile and nucleus. A total of 87 electron micrographs (26 from unstimulated, 28 from CCL11-stimulated, and 33 from TNF- α -stimulated cells) and 3259 secretory granules (1090 from unstimulated, 854 from CCL11-stimulated, and 1315 from TNF- α -stimulated eosinophils) were counted; and the numbers of intact granules, as well as the number of granules undergoing losses of their contents indicative of PMD (with lucent areas in their cores, matrices, or both, and reduced electron density and disassembled matrices and cores), or fused granules were established as before [14].

For immunonogold EM quantitative studies, electron micrographs randomly taken from unstimulated and stimulated eosinophils were evaluated, and the numbers of labeled and not labeled secretory granules ($n = 2005$ granules, 54 electron micrographs) and EoSVs ($n = 1945$, 23 electron micrographs) were counted in each cell section. Additionally, the numbers of labeled/unlabeled granules were correlated with the numbers of granules undergoing PMD or exocytosis. For TNF- α -stimulated eosinophils, secretory granules ($n = 460$) showing pools of CD63 from 10 cells were additionally quantitated in 2 areas: peripheral cytoplasm (1.0 *mm* wide from the plasma membrane), corresponding to one-third of the cell area; and within the inner cytoplasm (the contiguous cytoplasmic area deeper in the cell, corresponding to two-thirds of the cell area). These analyses were done in clear cross-cell sections exhibiting the entire eosinophil cell profile, intact plasma membranes, and nuclei. Lastly, 175 secretory granules showing pools of CD63 from CCL11-stimulated or TNF- α -stimulated cells and controls ($n = 29$ cells) were analyzed for quantification of the total granule area and area occupied by the CD63 immunolabeling in each granule.

All quantitative studies were performed using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Statistical analyses

One-way or 2-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test or the Student's *t* test was performed using GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Additionally, the normal distribution analysis (Shapiro-Wilk test) was used to evaluate the total area of the secretory granules and the area occupied by CD63. Significance was $P < 0.05$.

RESULTS

Extracellular labeling of CD63 reveals different patterns of immunoreactivity

In previous works, we and others demonstrated by immunofluorescence that CD63 is localized on the periphery of the resting major basic protein-positive secretory granules from human eosinophils in both intact, permeabilized cells and isolated by subcellular fractionation [14, 15, 17]. While examining extracellular labeling of CD63 in intact nonpermeabilized human eosinophils, stimulated or not with degranulation stimuli for 1 h (CCL11 or TNF- α), we clearly noticed different patterns of immunoreactivity for CD63 at the cell surface (Fig. 1A–C). Unstimulated cells showed weak or no fluorescence (Fig. 1A). CCL11 induced punctate, bright labeling (Fig. 1B), with focal immunofluorescent spots resembling secretion through PMD [24, 25], whereas a mostly diffuse fluorescence was observed in response to TNF- α stimulation (Fig. 1C). Controls in which the primary Ab was replaced by an irrelevant antibody were negative (not shown).

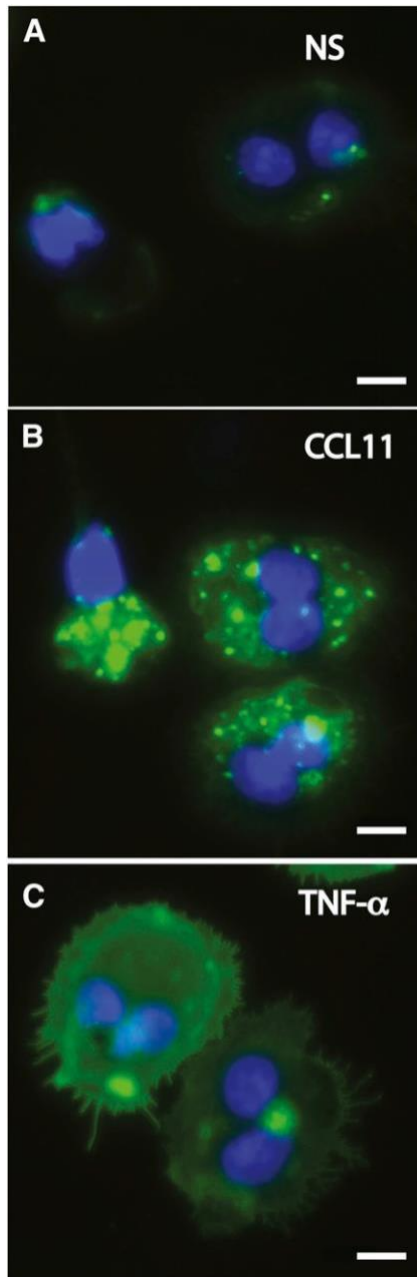


Figure 1. CD63 Immunolabeling in nonpermeabilized human eosinophils. Although unstimulated cells (A) show absent or weak fluorescence, a pool of CD63 imaged as green fluorescence is observed at the surface of cells stimulated with CCL11 (B) or TNF- α (C). Note that the immunoreactivity pattern is punctate with CCL11 (B) and mostly diffuse with TNF- α (C). Eosinophils were isolated by negative selection from the blood of healthy human donors, stimulated with CCL11 (B) or TNF- α (C) for 1 h, and incubated with mouse anti-human CD63 or isotype antibody, followed by secondary antibody (anti-mouse conjugated with Alexa Fluor 488). Control cells were kept in medium (A). Images are representative of 3 independent experiments. Scale bar, 2.3 μ m (A–C).

Because both CCL11 and TNF- α are robust stimuli that induce eosinophil secretion [27, 31, 33, 34], the presence of CD63 at the cell surface indicates that 1) this tetraspanin was mobilized from intracellular pools to the external cell surface in response to

stimulation, and 2) the surface expression of CD63, imaged through distinct patterns of fluorescence, might be associated with different secretory events.

CCL11 and TNF- α induce distinct secretory processes in human eosinophils

TEM is the only technique with resolution sufficient to clearly identify and distinguish between different modes of cell secretion [13]. To characterize ultrastructural events within secretory granules that underlie agonist-elicited secretion, freshly isolated human eosinophils were stimulated with CCL11 or TNF- α or kept in medium alone for 1 h, immediately fixed while still in suspension, and prepared for conventional TEM. As expected, cells stimulated with CCL11 showed a morphologic pattern of PMD, characterized by cytoplasmic vesiculation and progressive emptying of the contents from granule cores, surrounding matrices, or both, in the absence of granule fusions (Fig. 2A), as previously demonstrated [14]. Moreover, emptying granules with morphologic features of PMD were always intermingled, in the same cell section, with resting, nonmobilized granules (Fig. 2A), a hallmark of PMD [13, 14]. In contrast, TNF- α triggered a different secretory process—compound exocytosis—characterized by fusion of a number of granules with each other, leading to formation of large channels in the cytoplasm (Fig. 2B–D). These fused granules had clear losses of their contents (Fig. 2B–D). Connectivity between fused granules and the plasma membrane was observed and only the first granule of the channel was generally fused with the plasma membrane (Fig. 2D). The occurrence of TNF- α -induced compound exocytosis was also confirmed in samples prepared for TEM with a step of postfixation with reduced osmium, which increases granule membrane contrast, thus highlighting granule-fusion events (Supplemental Fig. 1).

To quantify the number of granules undergoing PMD or compound exocytosis, eosinophil sections showing the entire cell profile and nucleus were evaluated ($n = 87$), and a total of 3259 granules were analyzed. Eosinophil activation induced significant increases in the numbers of granules exhibiting morphologic changes. PMD was the predominant event found in CCL11-stimulated cells (13.0 \pm 1.7 granules/cell section, corresponding to 47.9 \pm 6.1% of the total number of granules, means \pm SEM, $n = 28$ cells), whereas TNF- α induced mostly compound exocytosis (26.7 \pm 1.9 granules/cell section, corresponding to 65.5 \pm 1.9%, means \pm SEM, $n = 33$ cells) (Fig. 2E). PMD was also found, to a lesser degree, in cells stimulated with TNF- α (Fig. 2E). In unstimulated cells, most granules were intact (38.1 \pm 1.8 granules/cell section, corresponding to 90.6 \pm 1.3% of the total number of granules, means \pm SEM, $n = 26$ cells) (Fig. 2E).

CD63 is strongly associated with PMD and compound exocytosis

To address the granule-associated distribution and trafficking of CD63 within CCL11-stimulated or TNF- α -stimulated eosinophils, we next performed ultrastructural labeling of this tetraspanin with a pre-embedding immunogold EM technique for optimal antigen preservation [28]. First, the numbers of

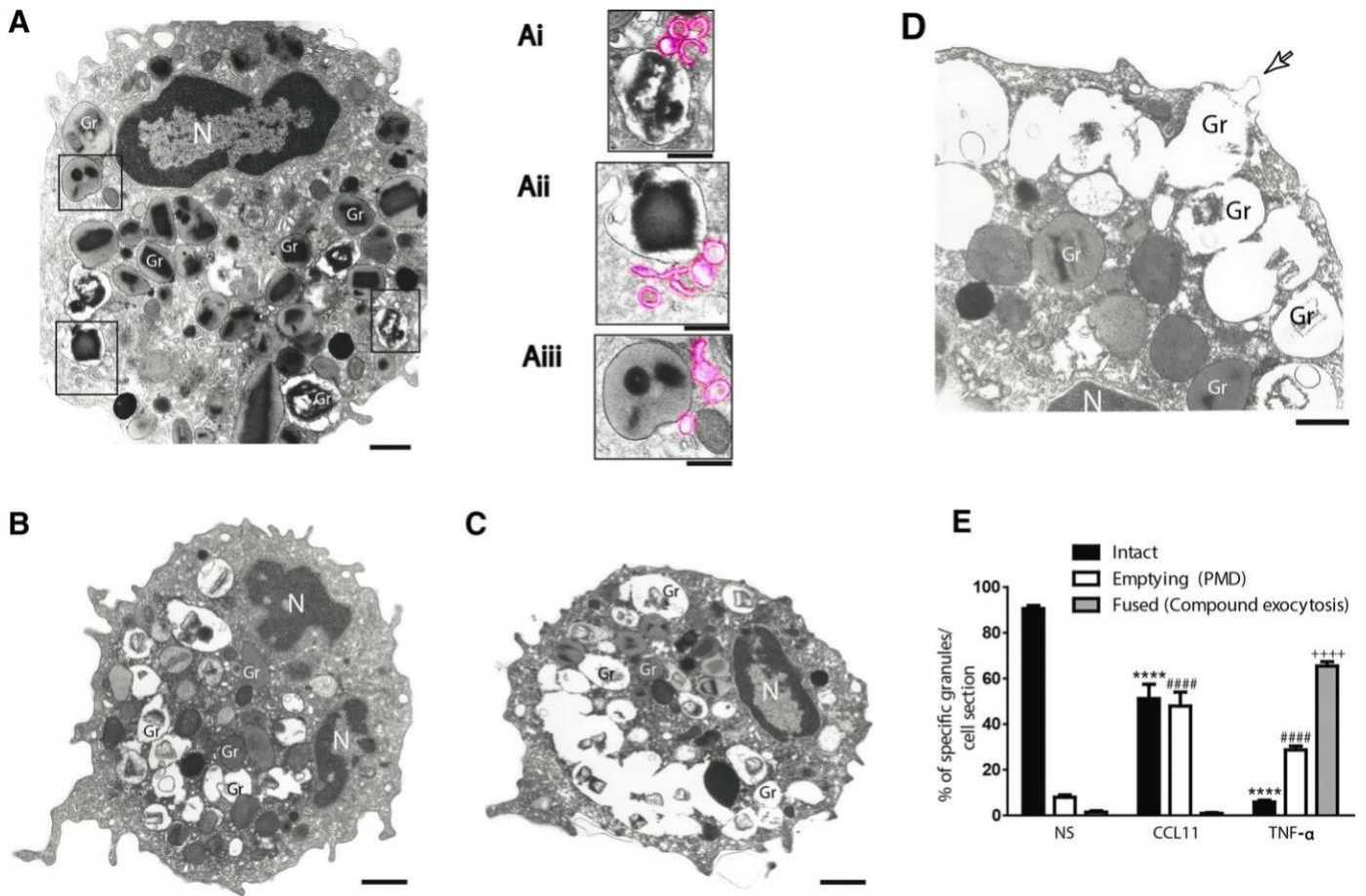


Figure 2. Conventional TEM identifies distinct, secretory processes, triggered by CCL11 and TNF- α stimulation. (A) PMD, characterized by progressive emptying of the secretory granules in the absence of granule fusions, was observed in response to CCL11. In (Ai–Aiii), note, in high magnification, the disarrangement of the granule cores and matrices. EoSVs, highlighted in pink, are seen around emptying granules. (B and C) Compound exocytosis, characterized by large channels formed by granule–granule fusions, was the predominant mode of secretion induced by TNF- α . In (D), granule losses and fusion of the first granule from the channel with the plasma membrane (arrow) are shown. (E) Significant increases in numbers of emptying or fused granules occurred after stimulation with CCL11 or TNF- α , respectively. Eosinophils were isolated from the peripheral blood by negative selection, immediately fixed, and processed for conventional TEM. Counts were derived from 3 experiments with 3259 granules counted in 87 electron micrographs randomly taken and showing the entire cell profile and nucleus. Scale bar, 700 nm (A), 315 nm (Ai–Aiii), 860 nm (B), 1.1 μ m (C), and 580 nm (D). Data represent means \pm SEM **** P , 0.0001 vs. control intact granules; #### P , 0.0001 vs. control-emptying granules; +++ P , 0.0001 vs. control-fused granules.

CD63-labeled and not labeled secretory granules were quantitated. In all groups, most specific granules were positive for CD63 (Fig. 3A).

In unstimulated cells, CD63 was localized primarily on the cytoplasmic surface of the secretory granules' limiting membranes, as demonstrated before by our group [15] (Fig. 3B and Bi). EoSVs were also labeled for CD63 (Fig. 3Bi, arrow).

CCL11 led to strong CD63 labeling of granules undergoing loss of their contents through PMD (Fig. 4A). These granules had different degrees of emptying and were uniformly distributed in the cytoplasm (Fig. 4A). CCL11 induced accumulation of CD63 within emptying granules, and intragranular CD63 pools were clearly seen (Fig. 4A and Supplementary Fig. 2). Labeling for CD63 was also observed at transport vesicles around, in contact with, or even inside, secretory granules, including EoSVs (Supplemental Fig. 2). A CD63⁺ "tail," budding from secretory

granules, likely a budding tubular vesicle, was frequently observed in thin sections of eosinophils (Supplemental Fig. 2). The presence of intact granules negative for CD63 close to highly labeled granules (Fig. 4A and Supplemental Fig. 2) and CD63 labeling at the cell surface (Supplemental Fig. 3) were noted.

Stimulation of eosinophils with TNF- α induced an immunolabeling pattern for CD63 markedly different than for CCL11. TNF- α -triggered compound exocytosis led to a robust labeling of granules mostly confined at the cell periphery, near the plasma membrane, whereas granules localized in the inner cytoplasm were not, or were weakly, labeled for CD63 (Fig. 4B). This immunolabeling pattern was very consistent, with different cell sections in the same field showing exactly the same aspect (Fig. 5). Large clusters of CD63 immunoreactivity were associated with channels or enlarged chambers formed by granule–granule fusions (Figs. 4 and 5). These channels/chambers had

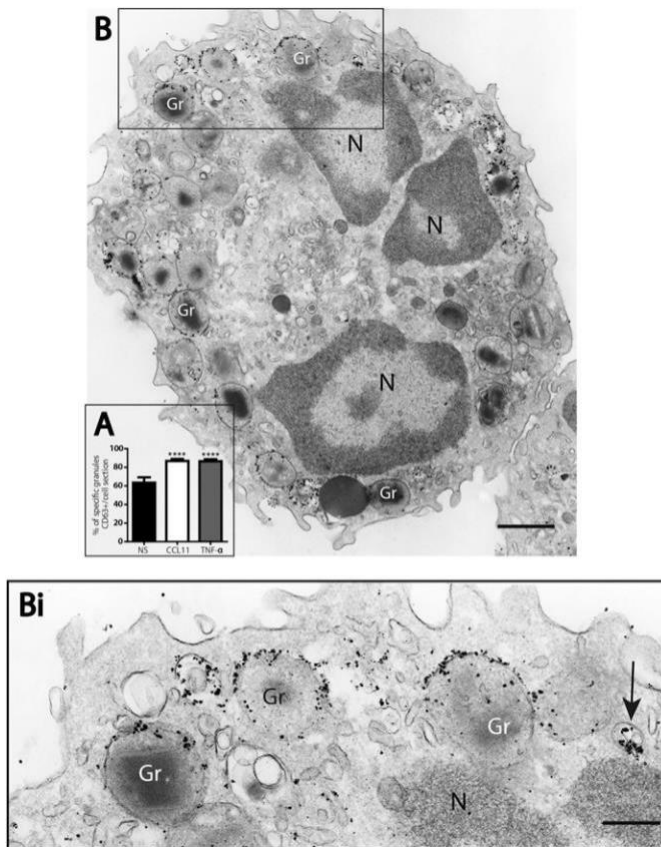


Figure 3. CD63 immunolabeling of secretory granules by immunogold EM. (A) Quantitative EM analyses revealed that most secretory granules were positive for CD63 in all groups. Stimulation led to significant increase in the numbers of CD63-labeled granules compared to unstimulated cells. (B) A representative electron micrograph of an unstimulated human eosinophil revealed CD63 labeling on the granules (Gr) limiting membranes. The boxed area in (B) is shown in higher magnification in (Bi). A CD63⁺ EoSv is indicated (arrow). Eosinophils were isolated from the peripheral blood, stimulated or not with CCL11 or TNF- α and prepared for pre-embedding immunogold EM. Counts were derived from, at least, 3 experiments with 2005 granules counted in 54 electron micrographs randomly taken and showing the entire cell profile and nucleus (N). Scale bars, 800 nm (B); 500 nm (Bi). *****P*, 0.0001 vs. control cells.

several residual cores or reduced electron-density, or both, indicative of content losses (Fig. 5). Interestingly, on granules localized beneath the plasma membrane, we frequently noticed a polarization of the CD63 immunolabeling at the granule side facing the plasma membrane (Fig. 5, arrowheads).

Next, because we noticed a marked difference in the cytoplasmic distribution of CD63⁺ granules in TNF- α -stimulated cells, we performed quantitative studies to develop more insight into CD63 intracellular trafficking. Granules showing pools of CD63 were counted in the peripheral cytoplasm of eosinophil cross sections, within a 1.0-mm-wide "belt" from the plasma membrane, corresponding to one-third of the cell area, as showed in Fig. 5A (red bars), and within the inner cytoplasm (the contiguous cytoplasmic area deeper in the cell, corresponding to two-thirds of the cell area). Quantitative EM

revealed that 75.0 \pm 4.5% (means \pm SEM, *n* = 460 granules) of the granules with pools of CD63 were localized at the cell periphery, whereas just 16.2 \pm 5.2% (means \pm SEM, *n* = 480 granules) of these organelles were distributed in the inner cytoplasm (Fig. 5B). Most secretory granules in the inner cytoplasm (83.7 \pm 5.2%) showed an absence, or very weak labeling, for CD63 (Fig. 5B). These quantitative data reinforce that CD63 traffics in the cytoplasm in concert with the movement of granules involved in compound exocytosis.

Control cells, from all conditions, in which the primary Ab was omitted or replaced by an irrelevant Ab were negative (Supplemental Fig. 4).

CD63 concentrates within granules actively participating in degranulation events

We next evaluated whether the eosinophil cellular content of CD63 changed in stimulated, compared with unstimulated, eosinophils. Western blotting analyses showed high levels of CD63 within eosinophils in all conditions that were similar in unstimulated and stimulated cells (Fig. 6A). This result was also observed with the use of an additional primary anti-CD63 Ab (data not shown).

Having not found a clear difference in the content of CD63 between unstimulated and stimulated eosinophils, we next evaluated the level of CD63 labeling on secretory granules. We

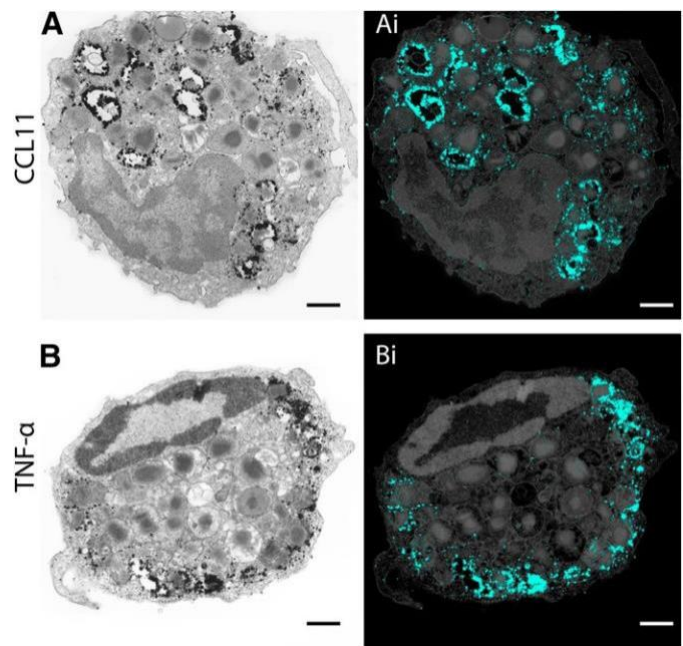


Figure 4. CD63 is strongly associated with secretory processes within human eosinophils. (A, B) Secretory granules (Gr) undergoing content release through PMD (A) or compound exocytosis (B) were intensely labeled for CD63. Note that although CD63⁺ granules were distributed in the entire cytoplasm in PMD (A), these organelles were concentrated in the peripheral cytoplasm in compound exocytosis (B). In (Ai and Bi), granules were highlighted in blue using Photoshop software. Cells were isolated from the peripheral blood, stimulated with CCL11 (A) or TNF- α (B) and prepared for pre-embedding immunogold EM. Scale bars, 915 nm (A, Ai), 680 nm (B, Bi).

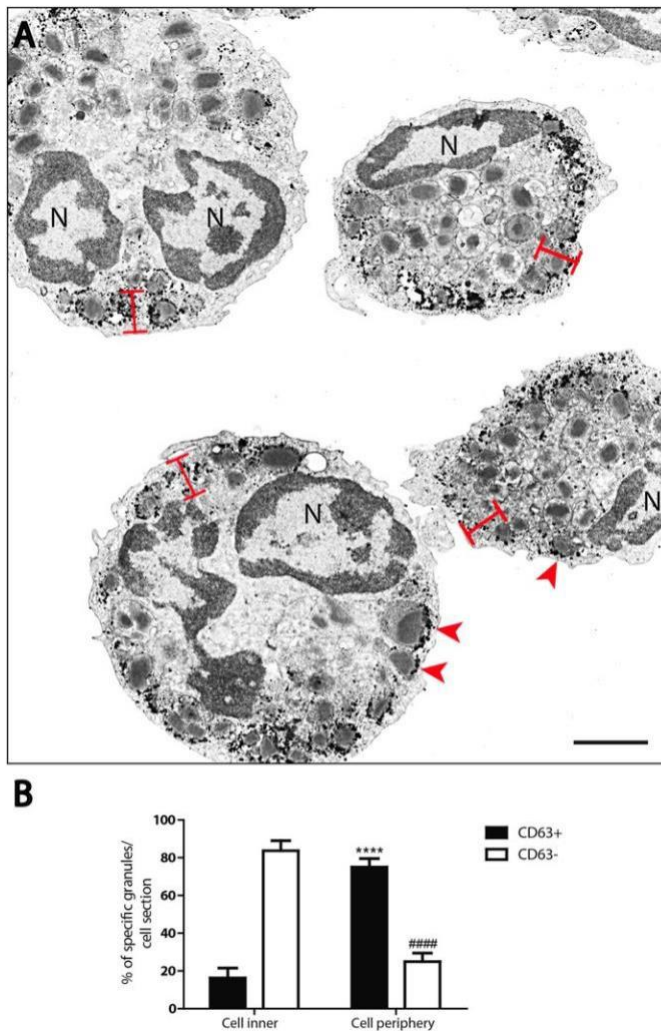


Figure 5. Differential distribution of CD63⁺ secretory granules within human eosinophils after stimulation with TNF- α . (A) A representative electron micrograph shows several cell sections with cytoplasmic CD63⁺ granules, mostly confined at the cell periphery, near the plasma membrane. Arrowheads indicate CD63 polarization on the granule face toward the plasma membrane. (B) Quantitative analyses of immunolabeled granules. Eosinophils were isolated from the peripheral blood, stimulated with TNF- α , and prepared for pre-embedding immunogold EM. A total of 460 granules from 10 sharp, cross-cell sections exhibiting the entire cell profile, intact plasma membrane, and nucleus were counted in the peripheral cytoplasm (1.0 mm wide from the plasma membrane, as indicated by the red bars) and within the inner cytoplasm (the contiguous cytoplasmic area deeper in the cell). Scale bar, 1.3 μ m. **** P , 0.0001 vs. CD63⁺ granules at cell inner area; #### P , 0.0001 vs. CD63² granules at cell inner area.

evaluated whether granules undergoing degranulation had more labeling compared with unstimulated (intact) granules. Our EM protocol uses very small gold particles (1.4 nm in diameter) covalently conjugated with Fab fragments, which are only one-third the size of a whole IgG molecule. These very small probes improve Ab penetration and provide more quantitative labeling of antigenic sites [28]. Considering that each Fab9 binds to one molecule of the antigen, quantification of the number of gold

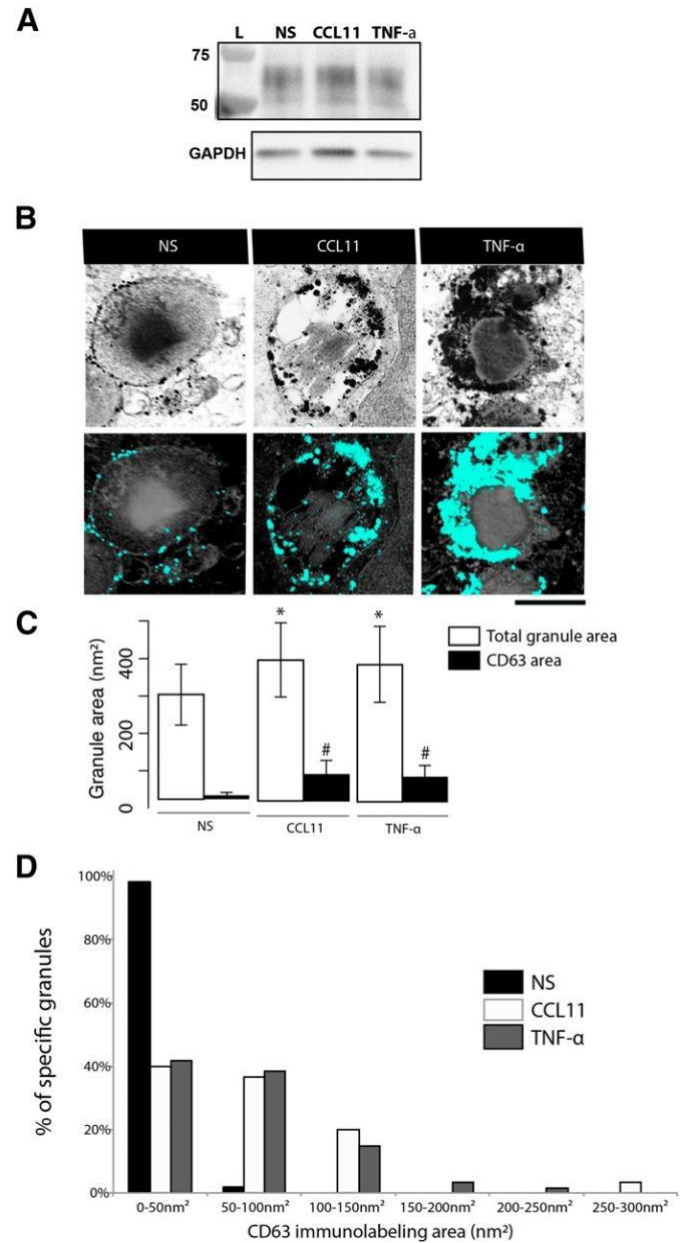


Figure 6. CD63 concentrates within granules undergoing active processes of secretion. (A) Representative CD63 expression in non-stimulated (NS), CCL11- or TNF- α -stimulated human eosinophils evaluated by western blotting ($n = 3$). L = lane. (B) Representative images of secretory granules at high resolution within human eosinophils after stimulation or not. Note that CD63 was concentrated within stimulated granules while in NS granules (intact) the labeling was mostly observed at the granule limiting membrane. (C) The total granule area as well as the CD63-immunolabeled area increased in response to stimulation (*, # P , 0.05 vs. NS). In (D), the variation of CD63-immunolabeled area in specific granules is shown in different groups. Eosinophils were isolated from the peripheral blood, stimulated or not with CCL11 or TNF- α and prepared for pre-embedding immunogold EM. A total of 175 secretory (specific) granules showing pools of CD63 from CCL11-stimulated or TNF- α -stimulated cells and controls ($n = 29$ cells) were analyzed for area quantification. Scale bar, 600 nm. Data represent means \pm SEM.

particles/granule would be informative. However, considering the intense immunolabeling in many secretory granules (Fig. 4), particle individualization was not always possible. We then evaluated the total granule area and the CD63-immunolabeled area in each granule. Our results showed that although the area labeled for CD63 corresponded to a mean $6 \pm 7.6 \text{ nm}^2$ per granule in unstimulated cells, the CD63-labeled area was $70.5 \pm 37.9 \text{ nm}^2$ and $65.5 \pm 25.7 \text{ nm}^2$ (means $6 \pm \text{SEM}$) per granule for CCL11 and TNF- α -stimulated cells, respectively (Fig. 6B and C). Moreover, in scoring the numbers of granules that exhibited CD63 labeling, in unstimulated cells, almost 100% of granules had an immunolabeled area $> 50 \text{ nm}^2/\text{granule}$, whereas both stimuli elicited a marked increase of intragranular labeling, such that $\approx 60\%$ of granules had a CD63 $^+$ area $> 50 \text{ nm}^2/\text{granule}$ (Fig. 6D). Individual granules exhibited an area up to 300 nm^2 labeled for CD63, which corresponds to $\approx 50\%$ of the total granule area (Fig. 6C and D) in stimulated cells. Of interest, granules undergoing release of their contents also showed an increase in their total area, that is, they were enlarged compared with intact granules (Fig. 6C).

Taken together, our data demonstrate that CD63 is highly associated with secretory events and is concentrated within granules undergoing active processes of secretion.

Large tubular carriers are involved in CD63 translocation

In this study, the presence of CD63-labeled EoSVs was noted in the cytoplasm of both unstimulated (Fig. 3Bi) and stimulated eosinophils (Supplemental Fig. 2 and Fig. 7A and B). Previous works from our group clearly showed that these vesicles associate with secretory granules, transport granule-derived products, and increase in number in response to cell activation [15, 31], and then we evaluated whether the numbers of EoSVs changed after stimulation. Indeed, both stimuli induced significant formation of EoSVs compared with control cells (Fig. 7C). Not only did the total numbers of EoSVs increase but also the numbers of CD63 $^+$ EoSVs increased after stimulation with both agonists (Fig. 7C). Interestingly, many EoSVs were seen contacting granules undergoing secretion by PMD, as previously demonstrated [31], as well as by compound exocytosis (Fig. 7A, B, and D). We further investigated whether CD63 $^+$ vesicles had a differential distribution in the cytoplasm of eosinophils undergoing compound exocytosis. For this, we quantitated the numbers of CD63 $^+$ EoSVs per cytoplasm region, as we did for secretory granules. Remarkably, most CD63 $^+$ EoSVs in the cytoplasm of TNF- α -stimulated cells were localized in the cell periphery (Figs. 7E and 8), in association with more CD63 $^+$ granules in this region (Figs. 5B and 8). EoSVs labeled for CD63 were clearly fused with these granules (Figs. 7B and 8). Our data strongly indicate that tubular vesicles are acting in the translocation of CD63 from and to intracellular compartments, particularly, secretory granules, in response to stimulation.

DISCUSSION

The secretory responses of the specific granules of eosinophils, including their "degranulation," underlie eosinophil responses to inflammatory, allergic, and immunoregulatory situations. Here,

we identified, for the first time, to our knowledge, that a major intracellular pool of CD63 is directly coupled to degranulation events of human eosinophils, specifically PMD and compound exocytosis. We demonstrated that, in response to stimulation, CD63 is localized within granules undergoing losses of their contents and that CD63 traffics with both transport vesicles and granule movements in the cytoplasm. Thus, we recognized active, intracellular trafficking of CD63 linked to the eosinophil secretory pathway.

To induce different modes of secretion in eosinophils, we stimulated the cells with CCL11 or TNF- α , which clearly elicited morphologic changes characteristic of PMD or compound exocytosis, respectively (Figs. 2 and 4). Both stimuli are known to promote eosinophil activation and release of products stored within secretory granules [23, 24, 26, 27, 30]. For example, the proinflammatory cytokine TNF- α proved to be a potent stimulus, eliciting secretions of IL-4, IL-6, and INF- γ from human eosinophils [27]. In fact, TNF- α was shown to be essential for INF- γ -induced secretion of Th1-type chemokines and to enhance IL-4-induced secretion of Th2-type chemokines by human eosinophils [26]. CCL11 stimulation of human eosinophils led to specific release of IL-4 [24]. Moreover, our group demonstrated that human eosinophil granules express functional CCR3 chemokine receptors [18] and secrete eosinophil cationic protein in response to CCL11 [18, 35].

Stimulation of human eosinophils with CCL11 or TNF- α led to cell surface up-regulation of CD63 (Fig. 1B and C and Supplemental Fig. 3). In contrast, Stubbs et al. [36] did not find CD63 expression at the eosinophil surface after stimulation with CCL11. This discrepancy with our results might be explained by the use of different times of stimulation or by the use of mixed-cell suspensions (eosinophils and neutrophils) instead of purified eosinophils [36]. On the other hand, our results are in accord with previous studies using other agonists considered as inducers of PMD, such as INF- γ [17] or platelet-activating factor [14], which were able to cause up-regulation of CD63 on human eosinophils [5, 17].

In fact, CD63 has been suggested to be involved with leukocyte secretory processes. For example, in human eosinophils, CD63 appeared to shift to the cell periphery after stimulation with INF- γ , potentially linking CD63 with PMD and providing initial evidence for CD63 translocation in the cytoplasm [17]. On the other hand, a study on histamine release in stimulated human basophils has associated CD63 expression with the compound exocytosis form of secretion [21]. However, because these studies used fluorescence microscopy and precise visualization of secretory processes is possible only at high resolution by TEM, a direct link between CD63 and the secretory pathway in leukocytes has remained elusive.

Here, we provided a comprehensive investigation of CD63 at the EM level. Our study, using an immunogold EM technique that combines both sensitive antigen detection and detailed information on the cell structure [28], revealed that CD63 is tightly associated not only with PMD but also with compound exocytosis. A notable, ultrastructural observation was that CD63 traffics in the cytoplasm in concert with the movement of granules involved in compound exocytosis (Figs. 4B and 5). CD63 may be acting as a secretion facilitator/regulator molecule,

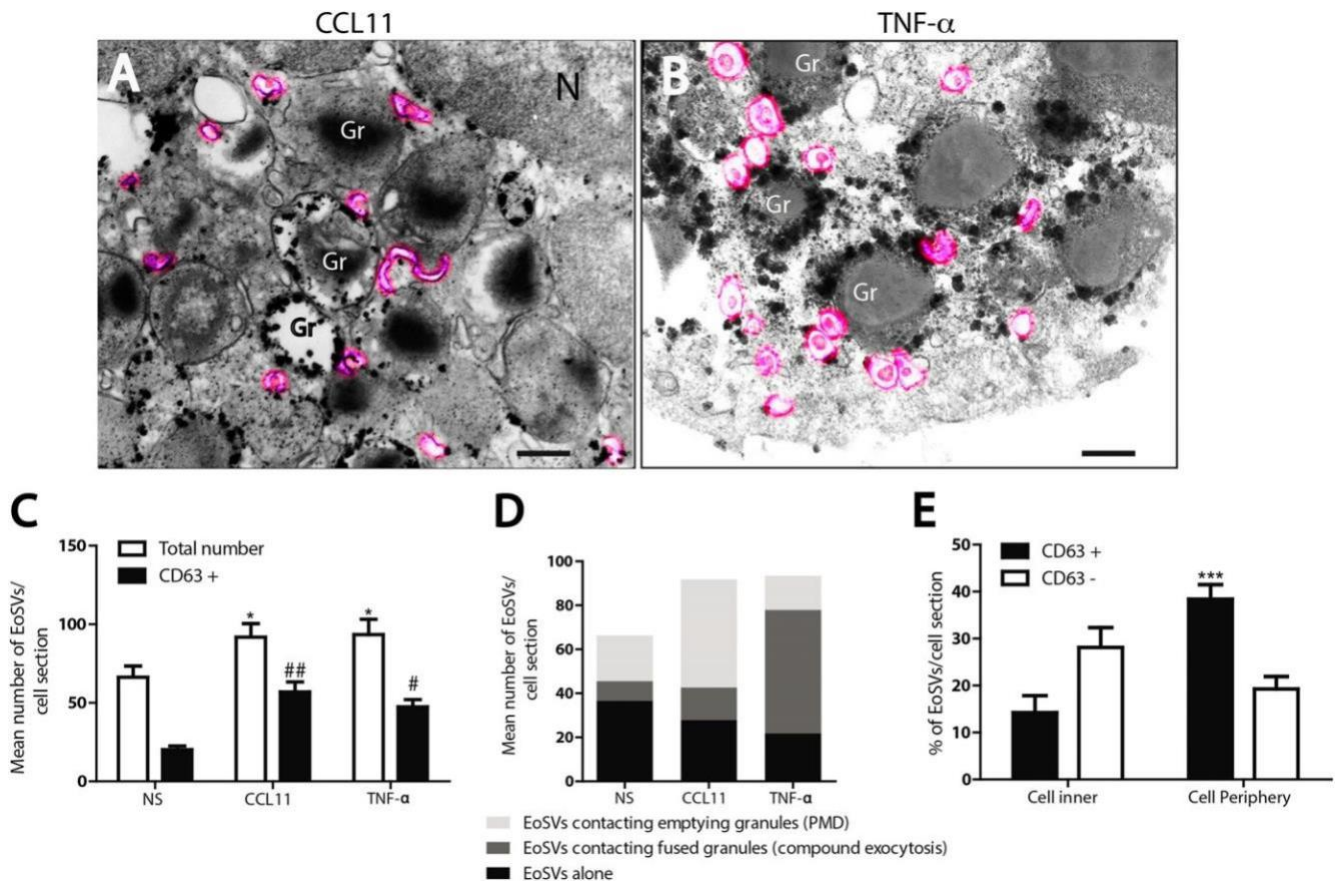


Figure 7. Vesicular trafficking of CD63 within human, stimulated eosinophils. (A and B) EoSVs (highlighted in pink) were observed in the cytoplasm surrounding or fused with secretory granules (Gr) within CCL11-stimulated (A) or TNF- α -stimulated cells. (C) Quantitative analyses of EoSV numbers. Note that, after stimulation, not only did the total number of EoSVs increase but also the number of CD63⁺ EoSVs. (D) Many EoSVs were seen contacting granules undergoing secretion. (E) After stimulation with TNF- α , most CD63⁺ EoSVs were observed in the cell periphery. Eosinophils were isolated from the peripheral blood, stimulated or not with CCL11 or TNF- α and prepared for pre-embedding immunogold EM. A total of 23 electron micrographs from unstimulated and stimulated cells were evaluated, and the numbers of labeled and not labeled EoSVs ($n = 1945$) were counted in each cell section. NS, not stimulated. * P , 0.05 vs. NS group (total EoSVs number); # P , 0.05 vs. NS group (CD63⁺ EoSVs); ## P , 0.01 vs. NS group (CD63⁺ EoSVs); *** P , 0.001 vs. CD63⁺ EoSVs at cell inner. Scale bar, 437 nm (A and Ai). Data represent means \pm SEM.

or it may have a more-direct role in the intracellular transport of granule-derived products. Further experiments, including dual-localization studies of CD63 and specific granule-stored products, will be required to explore this possibility.

One interesting observation from the present study was that although CD63 was observed at the eosinophil's cell surface after stimulation (Fig. 1B and C), a robust pool of CD63 seems to remain in the cytoplasm, as observed by immunogold EM (Fig. 4). This technique revealed that after 1 h of agonist stimulation, when a consistent loss of granule content was detected (Fig. 2), CD63 was still strongly observed in association with secretory granules (Fig. 4). Thus, we can conclude that a strong, intracellular pool of CD63 is implicated in the eosinophil secretory pathway and that most of this internal CD63 is not completely externalized in response to stimulation. By using flow cytometry, it was also demonstrated in human eosinophils that the CD63 expression at the cell surface increased after agonist stimulation (10 min), although the total intracellular CD63 expression was similar in resting and agonist-stimulated cells [17].

Our Western blotting results did not detect a difference in the CD63 total content when unstimulated and stimulated cells were compared (Fig. 6A). However, by EM, we observed that stimulated eosinophils had more CD63⁺ granules ($\approx 20\%$) (Fig. 3A). In addition, we demonstrated that CD63 was more-prominently detectable in granules in the process of secretion. Of note, our EM analyses were focused on specific granules, whereas Western blotting quantitated the total CD63 expression, which can be found in other compartments besides granules. The many CD63⁺ granules in both unstimulated and stimulated eosinophils and the Western blotting results indicate that CD63 is present as a robust, preformed pool in human eosinophils.

Our finding that pools of CD63 traffic between intracellular compartments raises the question how CD63—a transmembrane molecule—is transported in the cytoplasm. One possibility is that secretory granules in the process of content release acquire CD63 from membrane-bound transport carriers. Indeed, a remarkable finding was the marked increase of CD63⁺ EoSVs in stimulated cells. Additionally, the cytoplasmic distribution of these vesicles changed after TNF- α stimulation, increasing in number at the

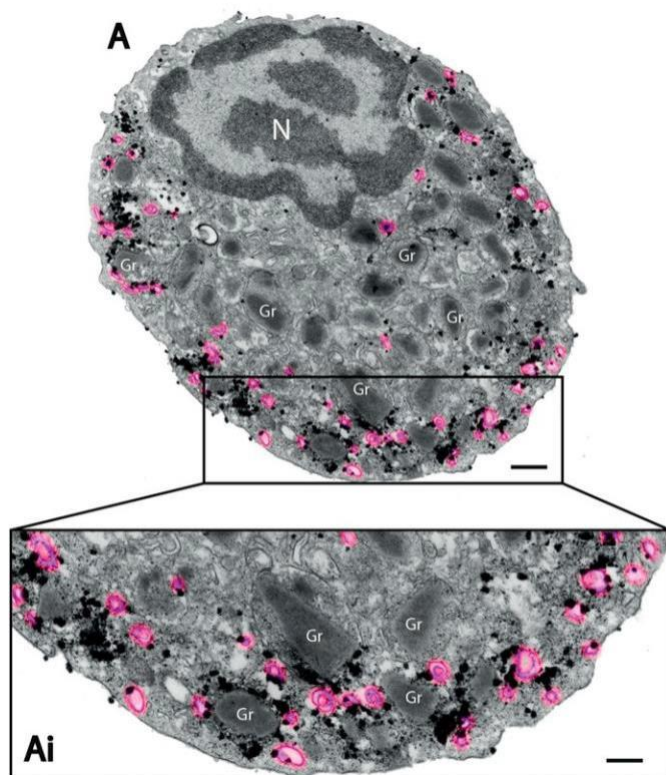


Figure 8. CD63 is translocated on EoSVs to or from secretory granules after stimulation with TNF- α . (A and Ai) A representative electron micrograph from an entire eosinophil profile shows CD63-labeled EoSVs (highlighted in pink), mostly at cell periphery, in association with CD63⁺ secretory granules (Gr). The boxed area in (A) is shown in higher magnification in (Ai). Eosinophils were isolated from peripheral blood, stimulated with TNF- α , and prepared for pre-embedding immunogold EM. N, nucleus. Scale bar, 950 nm (A), 630 nm (Ai).

cell periphery around fused granules. Thus, it is likely that EoSVs, which act in the transport of eosinophil granule cargos [37], are involved in the CD63 mobilization and transfer to secretory granules after fusion with these organelles, as frequently observed (Figs. 7B and 8). Accumulation of this tetraspanin within these organelles may be explained by the presence of intragranular membranes, which constitute an elaborate tubular network able to sequester and relocate granule products upon stimulation of human eosinophils [14]. The presence of CD63⁺ membranes has been recognized not only within eosinophil secretory granules [14] but also in other lysosome-related organelles, such as platelet- α granules [38] and MHC class II compartments in dendritic cells [39].

Taken together, our findings demonstrate that an intracellular CD63 trafficking is consistently connected to the secretory pathway of human eosinophils and is likely participating in the processes of release of granule-stored products.

AUTHORSHIP

R.C.N.M. provided the study conception and design. P.F.W. and R.C.N.M. provided study guidance, mentorship, and critical

editing of the manuscript. L.A.S.C., K.B., S.U., J.S.N., L.L., L.A.S., and R.C.N.M. performed experiments and acquired and analyzed the data. L.A.S.C., L.A.S., A.M.D., P.F.W., and R.C.N.M. interpreted data. L.A.S.C. and R.C.N.M. prepared the manuscript. P.F.W. and R.C.N.M. share senior authorship of this work. All authors contributed in part to writing and editing the manuscript and approved the final version.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by U.S. National Institutes of Health (NIH) National Institute of Allergy and Infectious Diseases Grants USA-R37AI020241 and R01AI022571; NIH National Heart, Lung, and Blood Institute Grant R01HL095699; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Grants Brazil477475/2013-2, 469995/2014-9, and 311083/2014-5; and the Brazilian Ministry of Health and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) Grant Brazil-CBB-APQ-02239-14. The authors gratefully acknowledge the skillful assistance of Ellen Morgan (Electron Microscopy Unit, Department of Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School).

DISCLOSURES

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Stow, J. L., Murray, R. Z. (2013) Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 227–239.
2. Spencer, L. A., Bonjour, K., Melo, R. C., Weller, P. F. (2014) Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. *Front. Immunol.* 5, 496.
3. Melo, R. C. N., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2012) Eosinophil ultrastructure. In *Eosinophils in health and disease*. (J. R. Lee and H. Rosenberg, eds.), Vol. 1. Elsevier, New York, p. 20–27.
4. McLaren, D. J., Mackenzie, C. D., Ramalho-Pinto, F. J. (1977) Ultrastructural observations on the in vitro interaction between rat eosinophils and some parasitic helminths (*Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis* and *Nippostrongylus brasiliensis*). *Clin. Exp. Immunol.* 30, 105–118.
5. Inoue, Y., Matsuwaki, Y., Shin, S. H., Ponikau, J. U., Kita, H. (2005) Nonpathogenic, environmental fungi induce activation and degranulation of human eosinophils. *J. Immunol.* 175, 5439–5447.
6. Karawajczyk, M., Sevéus, L., Garcia, R., Björnsson, E., Peterson, C. G., Roomans, G. M., Venge, P. (2000) Piecemeal degranulation of peripheral blood eosinophils: a study of allergic subjects during and out of the pollen season. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 521–529.
7. Erjefält, J. S., Greiff, L., Andersson, M., Adelroth, E., Jeffery, P. K., Persson, C. G. (2001) Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. *Thorax* 56, 341–344.
8. Ahlstrom-Emanuelsson, C. A., Greiff, L., Andersson, M., Persson, C. G., Erjefält, J. S. (2004) Eosinophil degranulation status in allergic rhinitis: observations before and during seasonal allergen exposure. *Eur. Respir. J.* 24, 750–757.
9. Cheng, J. F., Ott, N. L., Peterson, E. A., George, T. J., Hukee, M. J., Gleich, G. J., Leiferman, K. M. (1997) Dermal eosinophils in atopic dermatitis undergo cytolytic degeneration. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99, 683–692.
10. Caruso, R. A., Ieni, A., Fedele, F., Zuccalà, V., Riccardo, M., Parisi, E., Parisi, A. (2005) Degranulation patterns of eosinophils in advanced gastric carcinoma: an electron microscopic study. *Ultrastruct. Pathol.* 29, 29–36.
11. Raqib, R., Moly, P. K., Sarker, P., Qadri, F., Alam, N. H., Mathan, M., Andersson, J. (2003) Persistence of mucosal mast cells and eosinophils in Shigella-infected children. *Infect. Immun.* 71, 2684–2692.
12. Qadri, F., Bhuiyan, T. R., Dutta, K. K., Raqib, R., Alam, M. S., Alam, N. H., Svennerholm, A. M., Mathan, M. M. (2004) Acute dehydrating disease caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 induce increases in innate cells and inflammatory mediators at the mucosal surface of the gut. *Gut* 53, 62–69.

13. Melo, R. C. N., Weller, P. F. (2010) Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histol. Histopathol.* 25, 1341–1354.
14. Melo, R. C. N., Perez, S. A., Spencer, L. A., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2005) Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. *Traffic* 6, 866–879.
15. Melo, R. C. N., Spencer, L. A., Perez, S. A., Neves, J. S., Bafford, S. P., Morgan, E. S., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2009) Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. *Lab. Invest.* 89, 769–781.
16. Pols, M. S., Klumperman, J. (2009) Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* 315, 1584–1592.
17. Mahmudi-Azer, S., Downey, G. P., Moqbel, R. (2002) Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release. *Blood* 99, 4039–4047.
18. Neves, J. S., Perez, S. A., Spencer, L. A., Melo, R. C. N., Reynolds, L., Ghiran, I., Mahmudi-Azer, S., Odemuyiwa, S. O., Dvorak, A. M., Moqbel, R., Weller, P. F. (2008) Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18478–18483.
19. Kim, J. D., Willetts, L., Ochkur, S., Srivastava, N., Hamburg, R., Shayeganpour, A., Seabra, M. C., Lee, J. J., Moqbel, R., Lacy, P. (2013) An essential role for Rab27a GTPase in eosinophil exocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 94, 1265–1274.
20. Pak, V., Budikhina, A., Pashenkov, M., Pinegin, B. (2007) Neutrophil activity in chronic granulomatous disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 601, 69–74.
21. MacGlashan, Jr., D. (2010) Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. *Clin. Exp. Allergy* 40, 1365–1377.
22. Pfistershammer, K., Majdic, O., Stöckl, J., Zlabinger, G., Kirchberger, S., Steinberger, P., Knapp, W. (2004) CD63 as an activation-linked T cell costimulatory element. *J. Immunol.* 173, 6000–6008.
23. Egesten, A., Blom, M., Calafat, J., Janssen, H., Knol, E. F. (1998) Eosinophil granulocyte interaction with serum-opsonized particles: binding and degranulation are enhanced by tumor necrosis factor alpha. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 115, 121–128.
24. Bandeira-Melo, C., Sugiyama, K., Woods, L. J., Weller, P. F. (2001) Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J. Immunol.* 166, 4813–4817.
25. Bandeira-Melo, C., Perez, S. A., Melo, R. C. N., Ghiran, I., Weller, P. F. (2003) EliCell assay for the detection of released cytokines from eosinophils. *J. Immunol. Methods* 276, 227–237.
26. Liu, L. Y., Bates, M. E., Jarjour, N. N., Busse, W. W., Bertics, P. J., Kelly, E. A. (2007) Generation of Th1 and Th2 chemokines by human eosinophils: evidence for a critical role of TNF- α . *J. Immunol.* 179, 4840–4848.
27. Spencer, L. A., Szela, C. T., Perez, S. A., Kirchhoffer, C. L., Neves, J. S., Radke, A. L., Weller, P. F. (2009) Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J. Leukoc. Biol.* 85, 117–123.
28. Melo, R. C. N., Morgan, E., Monahan-Earley, R., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2014) Pre-embedding immunogold labeling to optimize protein localization at subcellular compartments and membrane microdomains of leukocytes. *Nat. Protoc.* 9, 2382–2394.
29. Bandeira-Melo, C., Gillard, G., Ghiran, I., Weller, P. F. (2000) EliCell: a gel-phase dual antibody capture and detection assay to measure cytokine release from eosinophils. *J. Immunol. Methods* 244, 105–115.
30. Carmo, L. A., Dias, F. F., Malta, K. K., Amaral, K. B., Shamri, R., Weller, P. F., Melo, R. C. N. (2015) Expression and subcellular localization of the Qa-SNARE syntaxin17 in human eosinophils. *Exp. Cell Res.* 337, 129–135.
31. Melo, R. C. N., Spencer, L. A., Perez, S. A., Ghiran, I., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2005) Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. *Traffic* 6, 1047–1057.
32. Dias, F. F., Amaral, K. B., Carmo, L. A., Shamri, R., Dvorak, A. M., Weller, P. F., Melo, R. C. N. (2014) Human eosinophil leukocytes express protein disulfide isomerase in secretory granules and vesicles: ultrastructural studies. *J. Histochem. Cytochem.* 62, 450–459.
33. Lintomen, L., Franchi, G., Nowill, A., Condino-Neto, A., de Nucci, G., Zanesco, A., Antunes, E. (2008) Human eosinophil adhesion and degranulation stimulated with eotaxin and RANTES in vitro: lack of interaction with nitric oxide. *BMC Pulm. Med.* 8, 13.
34. Willetts, L., Ochkur, S. I., Jacobsen, E. A., Lee, J. J., Lacy, P. (2014) Eosinophil shape change and secretion. *Methods Mol. Biol.* 1178, 111–128.
35. Ueki, S., Melo, R. C. N., Ghiran, I., Spencer, L. A., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2013) Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood* 121, 2074–2083.
36. Stubbs, V. E., Schratl, P., Hartnell, A., Williams, T. J., Peskar, B. A., Heinemann, A., Sabroe, I. (2002) Indomethacin causes prostaglandin D₂-like and eotaxin-like selective responses in eosinophils and basophils. *J. Biol. Chem.* 277, 26012–26020.
37. Melo, R. C. N., Spencer, L. A., Dvorak, A. M., Weller, P. F. (2008) Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *J. Leukoc. Biol.* 83, 229–236.
38. Heijnen, H. F., Debili, N., Vainchenker, W., Breton-Gorius, J., Geuze, H. J., Sixma, J. J. (1998) Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. *Blood* 91, 2313–2325.
39. Barois, N., de Saint-Vis, B., Lebecque, S., Geuze, H. J., Kleijmeer, M. J. (2002) MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. *Traffic* 3, 894–905.

KEY WORDS:
inflammation · immune responses · cell secretion · vesicular trafficking · transmission electron microscopy