

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Departamento de Morfologia

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Cinthia Palazzi Miranda da Silva

**ESTUDO DA ULTRAESTRUTURA MITOCONDRIAL DE
EOSINÓFILOS HUMANOS IMATUROS, MADUROS E NA SÍNDROME
DE HIPEREOSINOFILIA**

Belo Horizonte

2021

Cynthia Palazzi Miranda da Silva

**ESTUDO DA ULTRAESTRUTURA MITOCONDRIAL DE EOSINÓFILOS
HUMANOS IMATUROS, MADUROS E NA SÍNDROME DE HIPEREOSINOFILIA**

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

Orientadora: Dra. Rossana Correa Netto de Melo

Co-orientador: Dr. Hélio Chiarini-Garcia

Belo Horizonte
2021

043

Silva, Cinthia Palazzi Miranda da.

Estudo da ultraestrutura mitocondrial de eosinófilos humanos imaturos, maduros e na síndrome de hipereosinofilia [manuscrito] / Cinthia Palazzi Miranda da Silva. – 2021.

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

Orientadora: Dra. Rossana Correa Netto de Melo. Co-orientador: Dr. Hélio Chiarini-Garcia.

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

1. Biologia Celular. 2. Eosinófilos. 3. Mitocôndrias/ultraestrutura. 4. Microscopia Eletrônica de Transmissão. 5. Síndrome Hipereosinofílica. I. Melo, Rossana Correa Netto de. II. Chiarini-Garcia, Hélio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE


CINTHIA PALAZZI MIRANDA DA SILVA

341/2021
entrada
1º/2019
2019690130

Às quatorze horas do dia 28 de abril de 2021, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**ESTUDO DA ULTRAESTRUTURA MITOCONDRIAL DE EOSINÓFILOS HUMANOS IMATUROS, MADUROS E NA SÍNDROME DE HIPEREOSINOFILIA**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Rossana Correa Netto de Melo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Rossana Correa Netto de Melo	UFJF	Aprovada
Dr. Hélio Chiarini-Garcia	UFMG	Aprovada
Dra. Cristina Guatimosim Fonseca	UFMG/ICB	Aprovada
Dr. Kennedy Bonjour de Oliveira Ferreira	NOVA Faculdade/BH	Aprovada

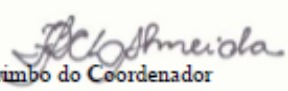
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 28 de abril de 2021.**

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

Dr. Hélio Chiarini-Garcia (Coorientador) 

Dr^a. Cristina Guatimosim Fonseca 

Dr. Kennedy Bonjour de Oliveira Ferreira 

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

Aos meus pais, Edson e Rosimeire, e a
todos os meus familiares e amigos.

O meu imenso agradecimento!

Aos professores Rossana e Hélio.

Pela orientação e condução nesse
trabalho!

AGRADECIMENTOS

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

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

A todo o grupo do Laboratório de Biologia Celular da UFJF, ao qual agradeço pelo que aprendi durante os anos de convivência, principalmente ao Thiago Silva e a Kassia Malta, que foram essenciais para que eu completasse minha jornada, pois meu deram suporte nos meus choros e lamentações, me incentivaram e me ajudaram muito na construção dessa dissertação se tornando além de colegas de laboratório grandes amigos que certamente vou levar para a vida. Agradeço também ao Kennedy que sempre me incentivou e tem grande influência na escolha do tema da dissertação, pois foi vendo seu trabalho com mitocôndrias que me senti motivada e incentivada a estudar o tema, além do incentivo a carreira de docência uma vez que ele viu em mim um potencial que eu mesma não via, além de me proporcionar muitas risadas e momentos de leveza. A Eliane que apesar de estar no grupo há pouco tempo, é alguém a quem tenho um carinho imenso, sendo essencial e fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, sempre contribuindo de forma inteligente e efetiva, principalmente na parte estatística ao qual ela juntamente com seu marido Luis Felipe, contribuíram para que a qualidade das análises ficasse impecável. Ao Victor Zarantonello, Lívia Andressa e Vitor Neves, meu muito obrigado pela contribuição em análises, ideias, discussões e trocas. Por mais que eu tenha tentado nas linhas acima, é impossível descrever o quanto vocês foram

importantes nesses anos, o quanto aprendi com cada um de vocês, o quanto me ensinaram a crescer como ser humano e como profissional.

Agradeço a professora Fernanda por todo carinho, acolhimento ensinamento e preocupação no tempo em que estive no LABER, além dos ensinamentos que ela me proporcionou durante minha formação no estágio didático.

Aos integrantes do LABER, da UFMG com os quais pude trocar experiências, vivências e aprendizados ao longo desses dois anos, muito obrigado pelo acolhimento e respeito que tiveram comigo durante o tempo em que estive em Belo Horizonte, em especial ao Fernando que se tornou um grande amigo, alguém a quem sempre recorro pra pedir conselhos e apoios, que sempre me garantiu muitas risadas e que me deu oportunidade de poder aprender mais quando me permitiu acompanhá-lo nos experimentos. Você é um amigo muito querido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular que recebeu o projeto de pesquisa e deu o aval para sua execução e aos professores da Morfologia que através das aulas, seminários e palestras, compartilharam toda sua experiência e conhecimento para garantir que a nossa formação fosse a melhor possível. Aprendi muito com vocês.

À UFMG por permitir a realização deste trabalho e servir como base do meu processo formativo me possibilitando a oportunidade de crescimento e amadurecimento no meio científico e a possibilidade de obtenção deste título há muito tão almejado por mim. Meu processo formativo se divide em antes e depois da presença da instituição na minha vida.

As agências de fomento CNPq, FAPEMIG, CAPES pelo apoio financeiro para participação em congressos e eventos científicos, em especial ao CNPq agência financiadora da bolsa que permitiu com que eu realizasse este trabalho.

À banca examinadora desta dissertação: Cristina Guatimosim e Kennedy Bonjour que se dispuseram e a contribuir de forma efetiva para a melhoria da qualidade científica do meu trabalho. Não seria possível sem vocês.

A TODOS que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, mesmo não sendo citados individualmente, meus sinceros agradecimentos, pois sei que embora a obtenção do título seja nominal os esforços para que se chegue a ele e os êxitos do processo são fruto de trabalho coletivo. Nunca terei palavra suficientes para

agradecer a todo o apoio que recebi durante o processo. O processo é desafiador mas gratificante. É impossível chegar lá sozinho!

“A emoção do conhecimento só a ciência pode despertar”
(Autor Desconhecido)

RESUMO

Os eosinófilos são células do sistema imune classicamente envolvidas em doenças alérgicas e infecciosas por helmintos. Mais recentemente, o eosinófilo foi reconhecido como um granulócito multifuncional pelo seu papel em diversos processos como apresentação de antígenos, imunorregulação, manutenção da homeostase, desenvolvimento e regulação de órgãos e tecidos e reparação tecidual e fibrose. Eosinófilos pré-sintetizam dezenas de proteínas e as armazenam em grânulos secretores, chamados grânulos específicos, os quais exibem morfologia única em termos de sua ultraestrutura. Diversos aspectos da rota secretora dessas células já se encontram elucidados em respostas imunes. No entanto, pouco se sabe sobre a população de mitocôndrias, sua dinâmica e organização estrutural durante o desenvolvimento e a maturação de eosinófilos e no contexto de doenças eosinofílicas. No presente trabalho, foram estudadas as características ultraestruturais de mitocôndrias durante o processo de maturação de eosinófilos humanos em culturas e em resposta à síndrome da hipereosinofilia humana (SHE), doença caracterizada por eosinofilia tanto no sangue periférico como nos tecidos. Amostras de eosinófilos imaturos e maduros de culturas assim como eosinófilos isolados do sangue e biópsias (pele) de pacientes com SHE foram processados para microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os seguintes aspectos foram avaliados quantitativamente em eletromicrografias: área, número, circularidade e padrão de cristas das mitocôndrias bem como a ocorrência de interação com outras organelas. Nossos resultados demonstraram que durante o processo de maturação de eosinófilos humanos, sua população de mitocôndrias sofre drástica redução. Tanto o número como a área média mitocondrial são reduzidas em 50% quando células imaturas são comparadas à células maduras em culturas. Além disso, o processo de maturação de eosinófilos humanos leva a uma redução significativa do número de cristas ($P < 0.05$). Em eosinófilos maduros de pacientes com SHE, o número e área de mitocôndrias, assim como o padrão de cristas dessas organelas difere dependendo do local em que se encontram. Enquanto eosinófilos circulantes têm maior população de mitocôndrias e predominância de cristas lamelares em comparação com eosinófilos teciduais, estes mostram um padrão de cristas denominado misto constituído tanto por cristas tubulares e lamelares. Considerando que as cristas mitocondriais estão intimamente associadas com o metabolismo/atividade funcional dessas organelas, esses dados demonstram que as mitocôndrias de eosinófilos respondem ao microambiente tecidual com alterações morfológicas de suas cristas. Além disso, as análises ultraestruturais revelaram estreita interação entre mitocôndrias e outras organelas, particularmente com grânulos específicos, tanto imaturos como maduros e corpúsculos lipídicos. Mitocôndrias parecem influenciar no processo de granulogênese, já que 45% de toda a população de mitocôndrias mantém contato com grânulos. Em conjunto, nossos dados indicam que as mitocôndrias de eosinófilos têm papel relevante no processo de granulogênese e respondem ao microambiente ao qual a célula está inserida com alterações estruturais e interações com outras organelas. Nossos achados reforçam o papel das mitocôndrias como organelas multifuncionais em células do sistema imune.

Palavras-chave: Eosinófilos. Mitocôndrias. Ultraestrutura. Microscopia Eletrônica de Transmissão. Síndrome de Hipereosinofilia Humana

ABSTRACT

Eosinophils are immune cells classically involved in allergic and infectious diseases caused by helminths. More recently, the eosinophil was recognized as a multifunctional granulocyte for its role in several processes such as antigen presentation, immunoregulation, maintenance of homeostasis, development and regulation of organs and tissues and fibrosis. Eosinophils pre-synthesize dozens of proteins and store them in secretory granules, called specific granules, which exhibit unique morphology in terms of their ultrastructure. Several aspects of the secretory pathway of these cells are already elucidated in immune responses. However, little is known about the population of mitochondria, their dynamics and structural organization during the eosinophil development and maturation and in the context of eosinophilic diseases. In the present work, the ultrastructural features of mitochondria were studied during the maturation process of human eosinophils in cultures and in response to the human hypereosinophilic syndrome (HES), a disease characterized by eosinophilia in both peripheral blood and tissues. Samples of immature and mature eosinophils from cultures as well as eosinophils isolated from blood and biopsies (skin) from HES patients were processed by transmission electron microscopy (TEM). Different aspects were quantitatively and quantitatively evaluated in electromicrographs such as: area, number, circularity and mitochondriacristae pattern, as well as the occurrence of interaction with other organelles. Our results showed that during the maturation process of human eosinophils, their mitochondria population is drastically reduced. Both the number and the average mitochondrial area are reduced by 50% when immature cells are compared to mature cells in cultures. In addition, the maturation process of human eosinophils leads to a significant reduction in the cristae number ($P < 0.05$). In mature eosinophils from patients with HES, the number and area of mitochondria, as well as the pattern of the cristae of these organelles, differs depending on where they are located. Although circulating eosinophils have a larger population of mitochondria and a predominance of lamellar ridges compared to tissue eosinophils, they show a pattern of ridges called mixed, which consists of tubular and lamellar pattern. Considering that the mitochondrial cristae are closely associated with the metabolism / functional activity of these organelles, these data demonstrate that the eosinophil mitochondrias respond to the tissue microenvironment with morphological changes in their cristae. In addition, ultrastructural analyses revealed a close interaction between mitochondria and other organelles, particularly with specific granules, both immature and mature, and lipid droplets. Mitochondria seem to influence the granulogenesis process, since 45% of the entire mitochondria population established contact with granules. Altogether, our data indicate that eosinophil mitochondria play an important role in the granulogenesis process and respond to the cell microenvironment with structural changes and interactions with other organelles. Our findings reinforce the role of mitochondria as multifunctional organelles in cells of the immune system

Key words: Eosinophils. Mitochondria. Ultrastructure. Transmission Electronic Microscopy. Hypereosinophilic Syndrome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Aspectos Multifuncionais de Eosinófilos	21
Figura 2: Ultraestrutura de um eosinófilo maduro	22
Figura 3: Estágios de diferenciação e maturação de eosinófilos.	23
Figura 4: Ultraestrutura de um eosinófilo imaturo (mielócito).	24
Figura 5: Granulôgenese de eosinófilos.	26
Figura 6: Mecanismos de Secreção de Eosinófilos.	27
Figura 7: Vesícula Sombbrero de Eosinófilos	30
Figura 8: Ultraestrutura de Corpúsculos Lipídicos.	32
Figura 9: Aspecto Ultraestrutural de Mitocôndrias	37
Figura 10: Funções Mitocondriais.	38
Figura 11: Quadrante radial estabelecido para análise de proximidade das organelas com mitocôndrias.	52
Figura 12: Distribuição citoplasmática de organelas de eosinófilos maduros e imaturos.	58
Figura 13: Distribuição mitocondrial em eosinófilos imaturos e maduros.	60
Figura 14: Área média e circularidade de mitocôndrias de eosinófilos imaturos e maduros:	61
Figura 15: Padrão e número de cristas mitocondriais em eosinófilos imatu- ros e maduros:	63
Figura 16: Interação de mitocôndrias com outras organelas em eosinófilos imaturos e maduros::	64
Figura 17: Interação de mitocôndrias com grânulos específicos imaturos.	66
Figura 18: Interação de mitocôndrias com grânulos específicos maduros.	68
Figura 19: Alterações mitocondriais em eosinófilos imaturos e maduros.	69
Figura 20: Eosinófilos envolvidos na SHE do sangue e da pele	71
Figura 21: Distribuição, área média e circularidade de mitocôndrias de eosinófilos na SHE:	73
Figura 22: Padrão e número de cristas mitocondriais em eosinófilos envolvi- dos na SHE	75
Figura 23: Interação de mitocôndrias com outras organelas em eosinófilos envolvidos na SHE:	77

Figura 24: Interação de mitocôndrias com Corpúsculos Lipídicos em eosinófilos maduros não estimulados e na SHE	79
Figura 25: Interação de mitocôndrias com grânulos específicos em eosinófilos na SHE:	81
Figura 26: Interação de mitocôndrias com EoSVs específicos em eosinófilos na SHE:.....	83
Figura 27: Alterações mitocondriais em eosinófilos envolvidos na SHE	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número total de células e mitocôndrias por amostra que foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão	49
Tabela 2: Análise de PCA para identificar quais as interações estabelecidas entre as mitocôndrias eosinofílicas e outras organelas celulares que são responsáveis pela maior variação observada	85
Tabela 3: Regressão Logística da ocorrência de SHE-Sangue e a SHE-Pele em função das interações estabelecidas entre as mitocôndrias eosinofílicas e outras organelas celulares	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APRIL	Ligante Indutor de Proliferação
ATP	Adenosina Trifosfato
BAK	Proteína BAK associada à Bcl-2
BAX	Proteína X associada à Bcl-2
BH3	Fatores pró-apoptóticos
BIDMC	Beth Israel Deaconess Medical Center
C/EBP, C/EBP α e C/EBP ϵ	Proteínas de Ligação Potencializadora
CCAAT	Sequência nucleotídica
CCL/Eotaxin	Ligante de Quimiocina de Motivo CC
CD	Cluster de Diferenciação
CL	Corpúsculo Lipídico
DAMP	Padrões Moleculares Associados a Danos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECP	Proteína catiônica do eosinófilo
EDN	Neurotoxina derivada do eosinófilo
EGF	Fatores de Crescimento Epitelial
EoSV	<i>Eosinophil Sombrero Vesicle</i>
EPO	Peroxidase eosinofílica
EPX	Peroxidase de eosinófilo
ETS/PU.1	E26 Específicos de Transformação
FGF	Fatores de Crescimento de Fibroblastos
GATA-1/FOG.1	Fator de Transcrição Eritróide

GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias
SHE	Síndrome Hipereosinofílica
HR	Receptores de Histamina
IFN- γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
IL-5R α	Receptor de Interleucina5
LPS	Lipopolissacarídeos
MBP	Proteína básica principal
ME	Mielócitos Eosinofílicos
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MHCII	Complexo Principal de Histocompatibilidade II
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Nucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Nucleotídeo
NF- $\kappa\beta$	Fator de transcrição nuclear kappa beta
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PMD	Desgranulação por piecemeal
RE	Retículo Endoplasmático
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 DESENVOLVIMENTO E REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 EOSINÓFILOS	20
2.1.1 Aspectos Gerais.....	20
2.1.2 Ultraestrutura de Eosinófilos.....	22
2.1.3 Eosinofiloiose e Maturação de Eosinófilos.....	23
2.1.4 Secreção Celular em Eosinófilos Ativados.....	26
2.1.4.1 Mecanismos de Secreção.....	26
2.1.4.1.1 Exocitose.....	26
2.1.4.1.2 Desgranulação por piecemeal.....	27
2.1.4.1.3 Citólise.....	27
2.1.5. Sistema Vesicular.....	28
2.1.6 Corpúsculo Lipídico.....	30
2.1.7 Funções de Eosinófilos.....	31
2.1.7.1 Remodelação e Reparo Tecidual.....	31
2.1.7.2 Apresentação de Antígenos.....	32
2.1.7.3 Imunomodulação.....	33
2.1.7.4 Homeostase.....	34
2.1.8 Eosinófilos e Hipereosinofilia.....	35
2.2 MITOCÔNDRIAS.....	35
2.2.1 Aspectos Gerais.....	35
2.2.2 Ultraestrutura.....	36
2.2.3 Funções Mitocondriais.....	37
2.2.3.1 Mitocôndrias e Respiração Celular.....	37
2.2.3.2 Mitocôndrias e Morte Celular.....	38
2.2.3.3 Mitocôndrias e Regulação de Íons Cálcio.....	38
2.2.3.4 Mitocôndrias e Metabolismo Lipídico.....	39
2.2.3.5 Mitofagia.....	39
2.2.3.6 Mitocôndrias e Produção de ROS.....	40
2.2.3.7 Padrões Moleculares Relacionadas a Dano (DAMP).....	41
2.2.4 Aspectos da Dinâmica Mitocondrial.....	42
2.2.4.1 Mitocôndria em Células do Sistema Imune.....	43
2.2.4.2 Mitocôndrias em Eosinófilos.....	43
3 OBJETIVOS.....	45
3.1 Objetivo Geral.....	45
3.2 Objetivos Específicos.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Coleta e Cultura de Eosinófilos do Cordão Umbilical.....	46

4.2 Coleta e Isolamento de Eosinófilos Maduros do Sangue Periférico.....	46
4.3 Obtenção de Eosinófilos de Pacientes com SHE.....	47
4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	47
4.5 Análises Ultraestruturais.....	48
4.5.1 Distribuição e Aspectos Ultraestruturais das Organelas Celulares.....	49
4.5.2 Quantidade de Mitocôndrias no Citoplasma de Eosinófilos.....	49
4.5.3 Análises Quantitativas de Mitocôndrias de Eosinófilos.....	49
4.5.4 Morfologia e Número de Cristas Mitocondriais.....	50
4.5.5 Interações de Proximidade das Mitocôndrias com Outras Organelas.....	51
4.5.5.1 Interações com RER, Golgi e Outras Mitocôndrias.....	52
4.5.5.2 Interações de Mitocôndrias com Corpúsculos Lipídicos.....	53
4.5.5.3 Interações de Mitocôndrias com Grânulos Específicos.....	54
4.5.5.3.1 Interação com Grânulos Específicos Imaturos.....	54
4.5.5.3.2 Interação com Grânulos Específicos Maduros.....	54
4.5.5.4 Interações Determinantes e Discriminantes de Eosinófilos na SHE.....	55
4.5.5.4.1 Análises de Componentes Principais.....	55
4.5.5.4.2 Modelo de Regressão Logística.....	55
4.5.6 Processos e Alterações Mitocondriais em Eosinófilos.....	55
4.6 Análises Quantitativas Ultraestruturais.....	56
4.7 Análise Estatística.....	57
5 RESULTADOS.....	58
5.1 Eosinófilos Imaturos e Maduros.....	58
5.1.1 Morfologia e Distribuição Citoplasmática de Organelas nos Eosinófilos...58	
5.1.2 Eosinófilos Imaturos e Maduros Diferem na Quantidade de Mitocôndrias.59	
5.1.3 Mitocôndrias Sofrem Alterações de Superfície Durante a Maturação.....60	
5.1.4 Eosinófilos têm Diminuição do Número de Cristas Durante a Maturação...61	
5.1.5 Ocorre Interação com Diferentes Organelas na Maturação de Eosinófilos...64	
5.1.6 Mitocôndrias Interagem com Grânulos em Formação na Maturação.....66	
5.1.7 Em Eosinófilos Imaturos 45% dos Grânulos Interagem com Mitocôndrias..66	
5.1.8 Mitocôndrias Interagem com Grânulos Mobilizados na Célula Madura.....67	
5.1.9 Nos Eosinófilos Maduros 14% dos Grânulos Interagem com Mitocôndrias.68	
5.1.10 Mitocôndrias de Eosinófilos Sofrem Alterações Durante a Maturação.....70	
5.2 Eosinófilos na Síndrome de Hipereosinofilia.....	71
5.2.1 Eosinófilos são Recrutados para o Sangue e a Pele no Contexto de SHE....71	
5.2.2 Eosinófilos na SHE Sofrem Alterações de Superfície no Sangue e na Pele..72	
5.2.3 Eosinófilos em Contextos de SHE não Alteram o Número de Cristas.....75	
5.2.4 Mitocôndrias Interagem com Diferentes Organelas na SHE.....76	
5.2.5 Mitocôndrias tem maior interação com corpúsculos na SHE da pele.....79	
5.2.6 A Interação de CL com a Mitocôndria Varia entre os Grupos.....79	
5.2.7 Na SHE Mitocôndrias estão Próximas de Grânulos Mobilizados.....80	
5.2.8 Na SHE Grânulos Mobilizados Interagem mais com Mitocôndrias.....81	

5.2.9 Mitocôndrias em Proximidade com EoSVs Ocorre na SHE da Pele.....	83
5.2.10 O Contato de EoSVs com Mitocôndrias Aumenta em Contextos de SHE..	84
5.2.11 Características de Eosinófilos nos Contextos de SHE.....	85
5.2.12 Alterações Mitocondriais no Contexto da SHE.....	86
6 DISCUSSÃO.....	88
7 CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS.....	91

1 INTRODUÇÃO

Aspectos estruturais e funcionais de mitocôndrias em células do sistema imune são ainda pouco estudados. Durante o desenvolvimento e maturação de eosinófilos humanos, a dinâmica da população mitocondrial bem como o remodelamento da arquitetura de cristas são desconhecidos. Além disso, pouco se sabe sobre a organização estrutural/dinâmica dessas organelas presentes em eosinófilos participando de doenças eosinofílicas, caracterizadas por eosinofilia tanto no sangue periférico como no tecido. No presente trabalho, pretende-se investigar as características ultraestruturais de mitocôndrias no processo de maturação de eosinófilos humanos em culturas e no contexto da síndrome da hipereosinofilia humana.

2 DESENVOLVIMENTO E REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EOSINÓFILOS

2.1.1 Aspectos Gerais

Os eosinófilos foram descobertos em 1879 por Paul Erlich em observações ao microscópio de luz. São células do sistema imune inato, conhecidas como granulócitos, oriundas da medula óssea, mas também estão presentes no sangue correspondendo a uma taxa de 3-5% do total de granulócitos circulantes. Os eosinófilos estão constantemente envolvidos em respostas inflamatórias que estão relacionadas a uma maior liberação de citocinas pré-formadas como as interleucinas IL-4, IL-13 e IL-10 e interferons (INF), que contribuem para amplificação da resposta imune (WEN; ROTHENBERG, 2017)

Os eosinófilos apresentam um núcleo bilobulado e grânulos citoplasmáticos específicos que armazenam proteínas como EDN (neurotoxina derivada de eosinófilos), MBP (proteína básica principal), EPO (peroxidase eosinofílica) e ECP (proteína catiônica de eosinófilo). Os grânulos específicos são organelas delimitadas por membrana e quando vistas por microscopia eletrônica de transmissão, apresentam núcleo cristalóide central elétron-denso delimitado por uma matriz elétron-lúcida (SPENCER, 2014)

Acreditava-se que os eosinófilos estavam envolvidos principalmente em respostas específicas do hospedeiro, como a resposta à infecção por helmintos e doenças alérgicas. No entanto, estudos recentes ampliam os papéis dessa célula tornando-a um granulócito multifuncional envolvido em diversos processos, como apresentação de antígenos, imunorregulação, manutenção da homeostase, desenvolvimento e regulação de órgãos e tecidos e mediação de reparação tecidual e fibrose. Nele também foi descrita uma variedade de receptores homeostáticos. (Figura 1) (WELLER; SPENCER, 2017)

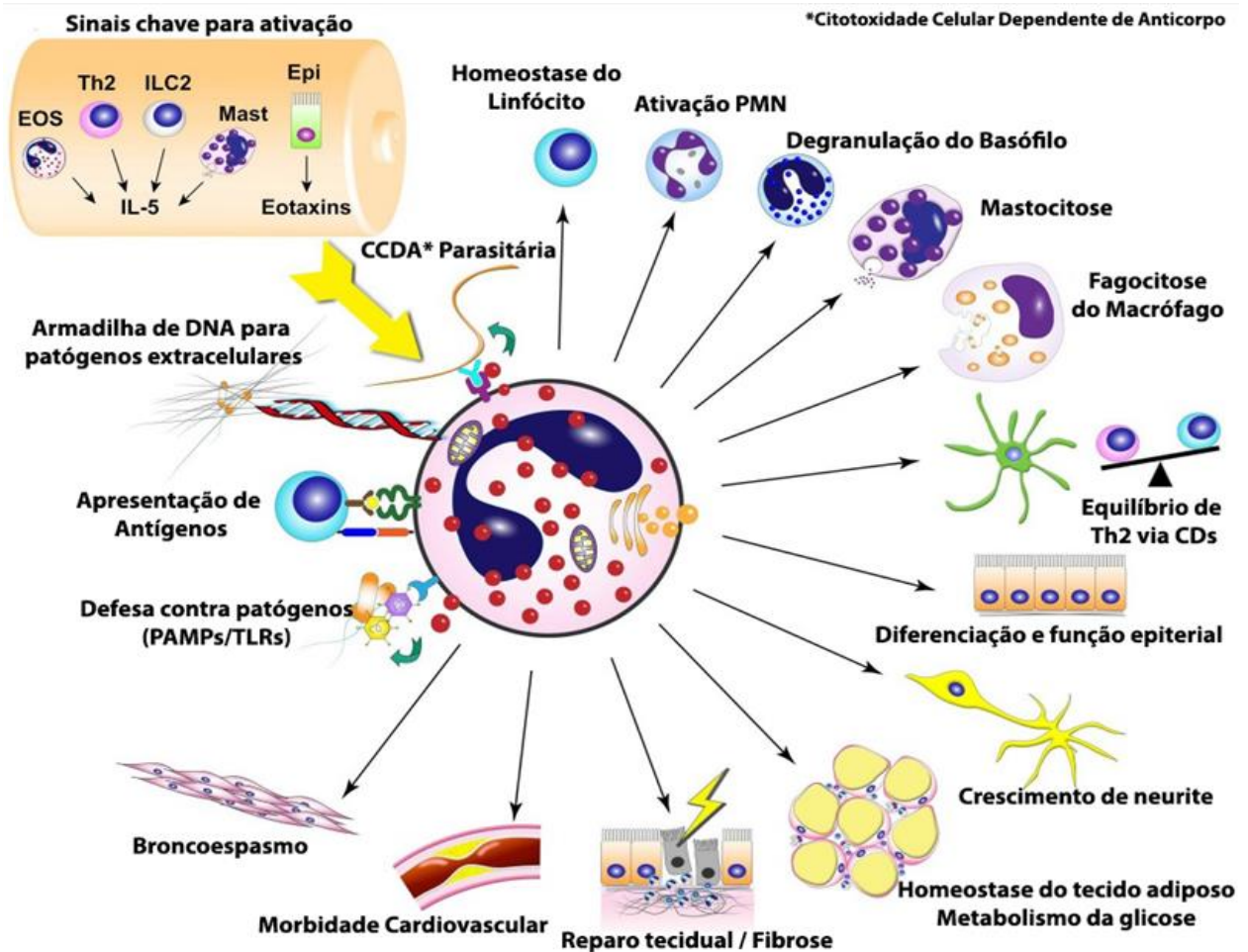


Figura 1: Aspectos multifuncionais de eosinófilos. Observa-se que eosinófilos desempenham diversas funções no organismo além de promoverem interações com o microambiente tanto em condições homeostáticas quanto em situações de doenças, através da liberação do conteúdo armazenado em seus grânulos. Participam de processos imunomodulatórios e homeostáticos como ocorre no tecido adiposo e no epitélio bem como da exacerbação do processo inflamatório em condições alérgicas e parasitárias. Adaptado de Wen, 2016 .

2.1.2 Ultraestrutura de Eosinófilos

Eosinófilos humanos maduros se distinguem morfológicamente por apresentarem uma grande população de grânulos secretores com um núcleo cristalino e central, denominado cristalóide, que usualmente se apresenta mais elétron-denso que a matriz que o circunda. Além disso, eosinófilos maduros são caracterizados por um núcleo tipicamente bilobulado com cromatina nuclear condensada marginalmente (Figura 2).(DVORAK; WELLER, 2000). Interessantemente, o citoplasma de eosinófilos humanos maduros apresentam um proeminente sistema vesicular, incluindo estruturas vesiculotubulares denominadas Vesículas Sombrode Eosinófilos (EoSVs) (Figura 2)(SPENCER, 2014)

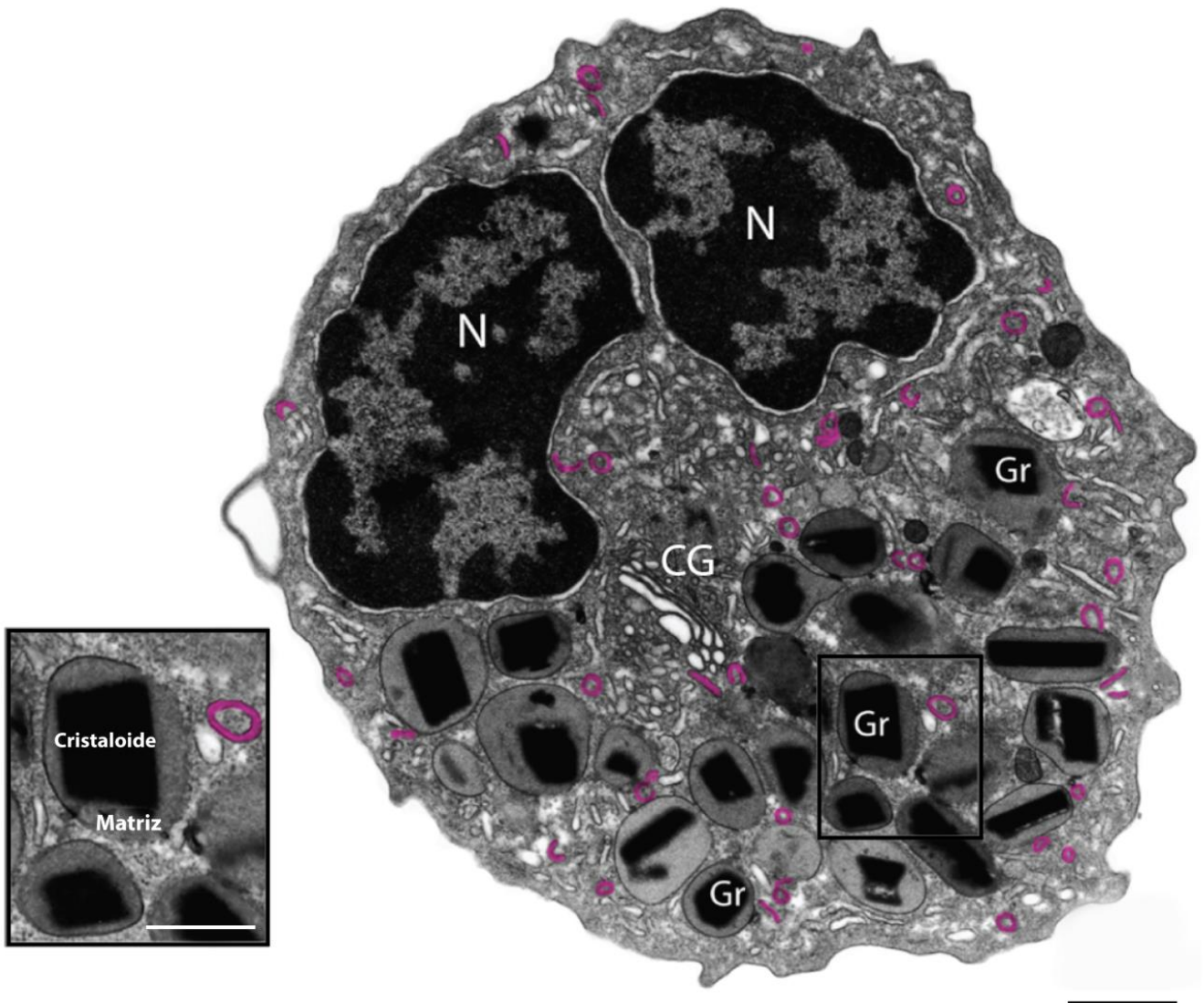


Figura 2- Ultraestrutura de um eosinófilo maduro. Em destaque, nota-se núcleo bilobulado(N) com cromatina condensada e marginalizada. Ainda grânulos específicos (Gr) espalhados pelo citoplasma, com morfologia típica apresentando cristalóide central elétron-denso envolto por uma matriz elétron-lúcida, que contribuem para seu fácil reconhecimento em MET, As estruturas colorizadas em rosa indicam as vesículas de eosinófilos denominadas sombrero (EoSvs), também características dessas células. Barra=2um. Adaptado de (SPENCER, 2014).

2.1.3 Eosinofiloiose e Maturação de Eosinófilos



Figura 3 – Estágios de diferenciação e maturação de eosinófilos. Observe que a maturação se inicia com um precursor comum a todos os granulócitos, os mieloblastos, à medida que a célula recebe os devidos estímulos, se diferencia em promielócito, uma linhagem comprometida de eosinófilos, mielócito, onde se inicia o processo de bilobulação do núcleo, metamielócito onde a célula já apresenta muitas características de maturação, até a fase madura, na qual a célula está pronta para ser ativada e responder a diversos estímulos. Adaptado de (AL-RABIA, 2003)

O microambiente da medula óssea é propício ao desenvolvimento de células tronco hematopoiéticas, pertencentes a todas as linhagens mieloides de células sanguíneas. Eosinófilos, por exemplo, originam-se de populações progenitoras de linhagens comprometidas, apresentando receptores essenciais a essas células como IL-5R α , no qual a interleucina-5 (IL-5), responsável pelo desenvolvimento e maturação de eosinófilos, se liga (KLION, 2020). Desta forma, os eosinófilos são produzidos na medula óssea a partir de células progenitoras pluripotentes, que se diferenciam em um precursor híbrido (i.g. mieloblasto). Em seguida ocorre a diferenciação em linhagens mielocíticas comprometidas com a diferenciação em eosinófilos (i.g. eosinófilos imaturos). Estes irão se desenvolver sequencialmente durante a maturação (pró-mielócito \square mielócito \square metamielócito) e dar origem ao eosinófilo maduro (Figura 3).

Figura 3 – Estágios de diferenciação e maturação de eosinófilos. Observe que a maturação se inicia com um precursor comum a todos os granulócitos, os mieloblastos, à medida que a célula recebe os devidos estímulos, se diferencia em promielócito, uma linhagem comprometida de eosinófilos, mielócito, onde se inicia o processo de bilobulação do núcleo, metamielócito onde a célula já apresenta muitas características de maturação, até a fase madura, na qual a célula está pronta para ser ativada e responder a diversos estímulos. Adaptado de (AL-RABIA, 2003)

A eosinofiloiose é regulada por um conjunto de fatores de transcrição, incluindo a expressão necessária de GATA-1 e baixos níveis do fator ETS PU. 1; regulação negativa de FOG-1; e expressão regulada temporalmente de membros da família da proteína de ligação ao intensificador de CCAAT (C / EBP), C / EBP α e C /

EBP ϵ , o último dos quais é expresso durante o desenvolvimento de eosinófilos como uma série de isoformas ativadoras e repressoras transcricionais sendo necessárias para a diferenciação terminal de eosinófilos (KLION, 2020; MCNAGNY; GRAF, 2002)

Uma série de citocinas e quimionas também está envolvida no processo se ligando a receptores expressos na superfície da célula. Além de IL-5, a interleucina-3 (IL-3), o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e a família da eotaxina (CCL11, CCL24 e CCL26) possuem papel relevante na diferenciação de eosinófilos (FULKERSON; ROTHENBERG, 2018; KLION, 2020)

Caracteristicamente, eosinófilos imaturos, como por exemplo, mielócitos eosinófilicos são células grandes (~9-12 μm) (LEE, 2012) apresentam núcleo grande, nucléolo proeminente e organelas de síntese (e.g. complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso) bastante desenvolvidos (Figura 4). Durante a maturação *in vivo* ou *in vitro*, os eosinófilos humanos sofrem uma série de mudanças ultraestruturais (mielócito \square eosinófilo maduro; compare Figura 4 com Figura 2). Desta forma ocorre principalmente: (i) a redução do tamanho da célula, (ii) segmentação e redução significativa do núcleo, (iii) o sistema de endomembranas sofre drásticas modificações com a clara redução em tamanho e volume das estruturas de retículo endoplasmático (RE) e Golgi (DVORAK; WELLER, 2000).

Os mieloblastos são células indiferenciadas que não apresentam grânulos citoplasmáticos (Figura 3). Grânulos específicos imaturos surgem inicialmente em pró-mielócitos e passam por uma série de transformações que irão dar origem a grânulos específicos maduros. Vale a pena ressaltar que o processo de maturação dos grânulos específicos pode ocorrer independentemente do estágio de maturação da célula. No entanto, o aspecto ultraestrutural e a quantidade de grânulos imaturos está intimamente relacionado com os estágios de maturação do eosinófilo (MELO; WELLER, 2018). Por MET, inicialmente os grânulos imaturos apresentam aspecto homogeneamente elétron-denso, sem a presença de um cristalóide central, e gradativamente se compactam e reduzem em tamanho, ao longo da maturação (0,5-1- μm de diâmetro), bem como alteram seu formato para esférico (Figura 5) (DVORAK; WELLER, 2000; MELO; WELLER, 2018). Eosinófilos imaturos iniciais (pró-mielócitos e mielócitos) apresentam grande quantidade de grânulos específicos imaturos (>50%), enquanto que em metamielócitos e eosinófilos maduros mais da metade dos seus grânulos são maduros.

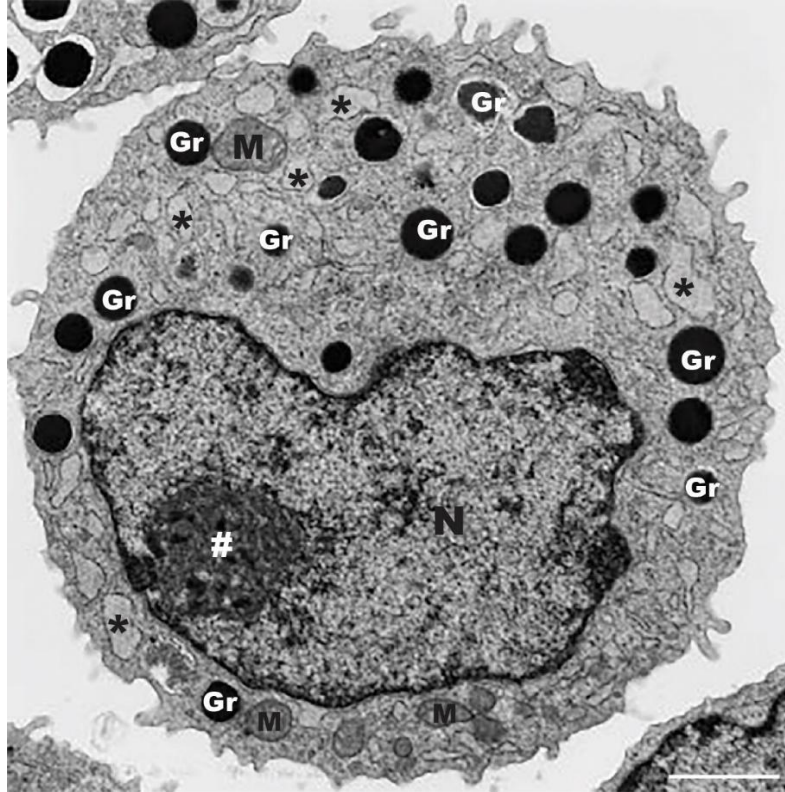


Figura 4- Ultraestrutura de um eosinófilo imaturo (mielócito). Observe um grande núcleo (N) euromático, excêntrico, com um único lóbulo, apresentando um nucléolo (#) bem desenvolvido. No citoplasma, note numerosos grânulos imaturos (Gr) que se apresentam arredondados e homogeneamente elétron-densos, sem a presença de núcleo cristalóide. Numerosas cisternas dilatadas de retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias são também observadas no citoplasma. Barra = 2 μ m. Adaptado de (DVORAK; SAITO; ESTRELLA; KISSELL *et al.*, 1989)

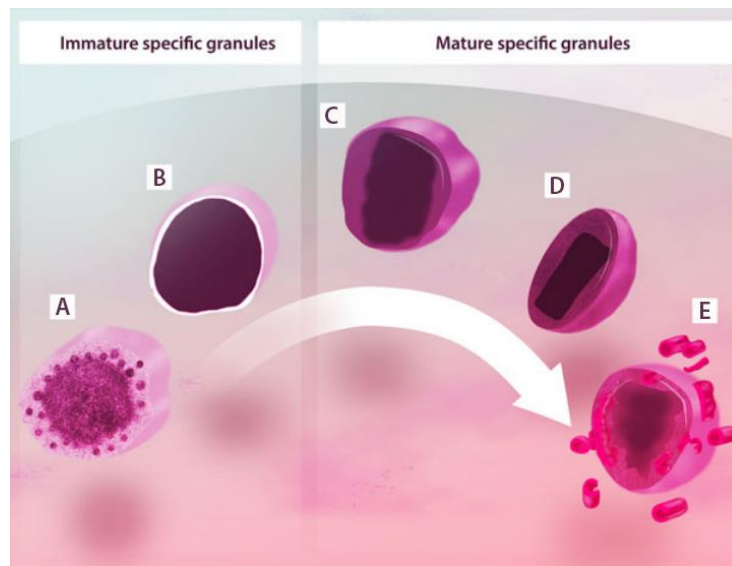


Figura 5-Granulôgenese de eosinófilos. Os grânulos de eosinófilos humanos maduros são de um único tipo, derivados por transição de grânulos tubulares esféricos. Durante a maturação na medula óssea, grânulos específicos imaturos sofrem condensação e cristalização de seus cristalóides. Observe (A) grânulos imaturos em processo de condensação mostrando vesículas intragranulares circundando o conteúdo denso; (B) Grânulo redondo imaturo com conteúdo homogeneamente denso; (C) Grânulo contendo um núcleo esférico visto com uma área central eletron-densa circundada por uma região menos densa; (D) Grânulo elíptico em repouso com um núcleo elétron-denso bem definido e uma matriz elétron-lúcida; (E) Um grânulo ativado mostra desmontagem de seu núcleo e matriz e formação de estruturas vesiculotubulares (EoSvs). Todos os grânulos são delimitados por uma membrana de bicamada fosfolípídica. Uma mistura dos grânulos (A), (B) e (C) é observada nas células precursoras (mielócitoseosinofílicas) da linhagem eosinofílica. A densidade desses grânulos é variável. Inicialmente, um pequeno número de grânulos com cristalóide (C) é visto entre um grande número de grânulos sem cristalóide (A e B). Grânulos (D) e (E) são típicos de eosinófilos maduros do sangue periférico e tecidos. Adaptado de (MELO; WELLER, 2018)

2.1.4 Secreção Celular em Eosinófilos Ativados

2.1.4.1 Mecanismos de Secreção

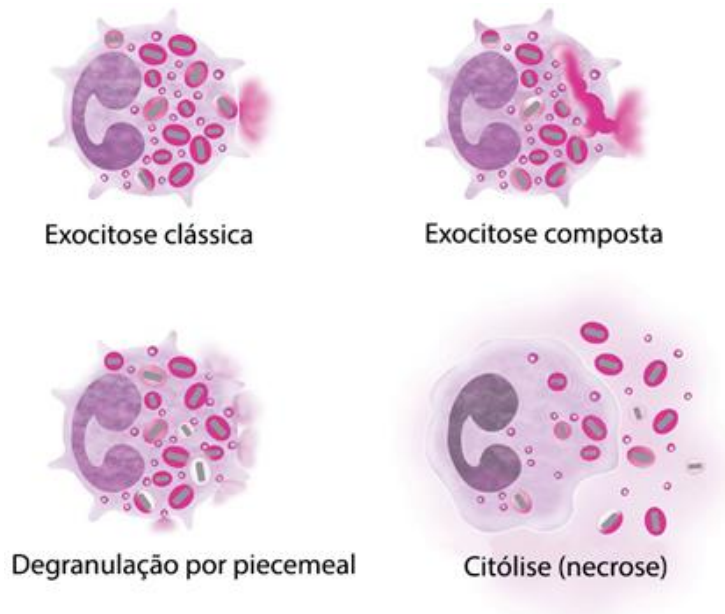


Figura 6- Mecanismos de Secreção de Eosinófilos. Nesse esquema observa-se que eosinófilos podem secretar suas proteínas armazenadas nos grânulos por exocitose clássica (fusão do grânulo com a membrana plasmática com liberação extracelular de conteúdo desse grânulo) exocitose composta (fusão grânulo-grânulo antes da liberação extracelular), por desgranulação por *piecemeal* (transporte vesicular de pequenos pacotes de materiais dos grânulos secretores para a superfície celular) e citólise deposição extracelular de grânulos após lise celular) Adaptado de (SPENCER; BONJOUR; MELO; WELLER, 2014)

A observação detalhada dos processos secretores de eosinófilos só é possível em alta resolução com o uso de MET que possibilita a distinção de três processos de secreção: exocitose (clássica e composta), desgranulação por *piecemeal* (PMD) e citólise (Figura 4).

2.1.4.1.1 Exocitose

Mecanismo clássico de liberação de produtos estocados, a exocitose é marcada por uma sequência de eventos orquestrados que culminam na liberação do conteúdo armazenado nos grânulos. Primeiro os grânulos migram até a membrana plasmática, e se liga a ela o que permite a fusão das membranas. Na sequência, ocorre a formação de um poro e os grânulos liberam seus conteúdos (LOGAN, 2003)

Esse processo pode ocorrer com um único grânulo que se funde a membrana como é o caso da exocitose clássica, ou a fusão de dois ou mais grânulos entre si, que podem formar câmaras de secreção que posteriormente se fundem a membrana plasmática, liberando dessa forma seu conteúdo de maneira mais concentrada e direcionada como é o caso da exocitose composta. Esse processo ocorre com mais frequência em eosinófilos envolvidos em determinados tipos de doenças fúngicas como aspergilose e parasitárias como strongiloidiose em células *in vitro* (AL-RABIA; BLAYLOCK; SEXTON; THOMSON *et al.*, 2003; MELO; WELLER, 2018)

2.1.4.1.2 Desgranulação por piecemeal

Esse processo secretor é considerado mais refinado e seletivo se comparado a exocitose (clássica e composta) e à citólise. É caracterizado pelo esvaziamento progressivo dos grânulos de secreção, o desarranjo do cristalóide e a reduzida densidade eletrônica de grânulos sendo orquestrado por vesículas transportadoras tubulares que brotam a partir dos grânulos específicos e fundem-se à membrana plasmática. Corresponde ao mecanismo de secreção observado com mais frequência em eosinófilos (MELO; WELLER, 2010; MELO; WELLER, 2018)

Nesse processo a secreção de produtos derivados do grânulo depende do tráfego vesicular para secreção diferencial de citocinas, dentre elas as EoSVs, vesículas específicas de eosinófilos com formato bem característico (ver mais detalhes no tópico 1.1.5)

2.1.4.1.3 Citólise

A citólise é um tipo de morte celular caracterizada pela ruptura da membrana plasmática, seguida por deposições de grânulos específicos, que permanecem ativos mesmo após o rompimento ou degradação da membrana plasmática celular. Neste processo, a célula libera seus conteúdos citoplasmático no tecido e assim, contribui para exacerbação e persistência da resposta inflamatória (MELO, R.C.N. ET AL., 2013)Esse processo é comumente observado em contextos de asma e algumas doenças intestinais(MELO; WELLER, 2018).

2.1.5 Sistema Vesicular

A liberação e o carreamento de vesículas são recursos amplamente utilizados pelas células para o transporte de conteúdos intracelularmente ou mesmo entre células, constituindo-se um dos principais mecanismos de sinalização celular. Esses conteúdos normalmente são derivados da rede Golgi-Retículo Endoplasmático que constitui uma das vias canônicas mais usuais para a sinalização e translocação de conteúdo por meio de uma rede vesicular.

No entanto, algumas células, principalmente àquelas pertencentes ao sistema imune, como os granulócitos, possuem grânulos nos quais estocam produtos pré-

formados que contribuem para a sinalização e ativação dessas células fazendo uso de vias menos convencionais para liberação desses produtos. Em eosinófilos, por exemplo, a PMD é um mecanismo secretor seletivodirecionado por um sistema vesicular complexo e altamente eficiente que carrega conteúdos estocados nos grânulos para o meio extracelular e contribui para a ativação e resposta a estímulos pelos eosinófilos(MELO, R.C.N.; WELLER, P.F., 2016)

Em eosinófilos humanos, essas vesículas apresentam formatos variados. Algumas possuem formato tubular e, por essa razão são denominadas vesículas tubulares (Figura 5), cuja dimensão é cerca de 50 nm, enquanto outras apresentam morfologia mais excêntrica e característica dessa célula como é o caso das vesículas sombrero (EoSVs), que receberam esse nome por terem sua forma associada aos tradicionais chapéus mexicanos, apresentando um citoplasma central delimitado por membrana, também pode apresentar morfologia em C(MELO, 2005). Tais vesículas são maiores em tamanho, entre 150-300 nm, se comparadas as vesículas tubulares, além de serem capazes de carrear produtos mais específicos dos grânulos até a membrana liberando o conteúdo extracelularmente (MELO, 2008)

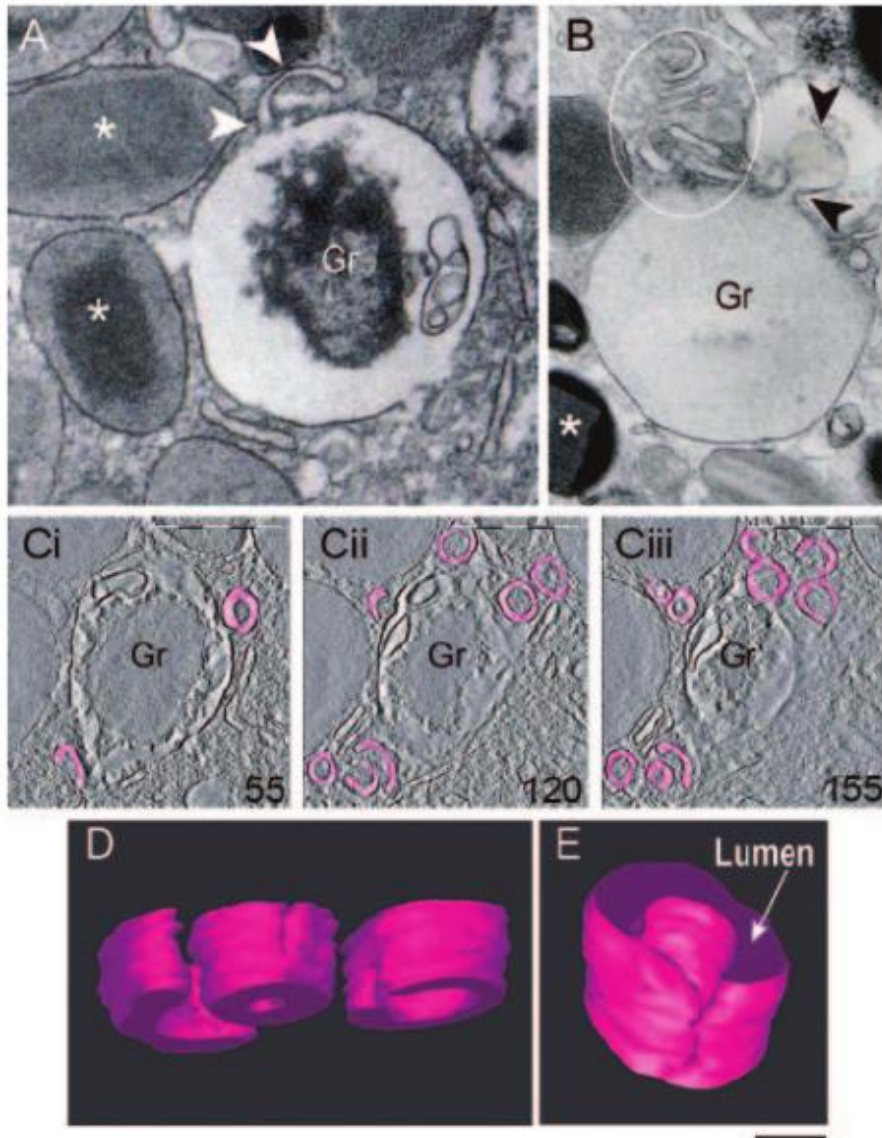


Figura 7- Vesícula Sombrero de Eosinófilos. As EoSVs são formados a partir de grânulos de eosinófilos mobilizados. (A e B) Imagens de MET convencionais, mostrando estágios progressivos de esvaziamento do grânulo. (A) Uma extensão tubular clara (pontas de seta) é vista na superfície do grânulo (Gr). Observe ainda o cristalóide desordenado dentro do grânulo em esvaziamento. (*) Grânulos intactos. (B) Vários perfis de EoSV (círculo) estão próximos do grânulo em esvaziamento. As pontas de seta apontam para uma grande vesícula, aparentemente formada a partir da superfície do grânulo. * Grânulos completos. (C) Cortes seriados representativos obtidos a partir de tomografia eletrônica de um grânulo mobilizado, mostram mudanças substanciais associadas à formação de EoSV. Os números nos cantos inferiores direitos dos painéis indicam o número de cortes utilizados na reconstrução tridimensional das vesículas através do volume tomográfico (D, E). EoSVs, destacadas em rosa, são representadas como estruturas abertas em forma tubular. Barras originais = 300 nm (A, B); 500 nm (C); 150 nm (D); 100 nm (E); 100 nm. Adaptado de (MELO, 2008)

2.1.6 Corpúsculos Lipídicos

Corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas intracelulares compostas por um núcleo hidrofóbico de lipídios neutros, mais comumente triacilglicerol e ésteres de esteroide que diferentemente de todas as outras endomembranas dispõem apenas de

uma hemimebranafosfolipídica a qual é envolvida por um conjunto específico de proteínas. Os CLs são organelas evolutivamente conservadas, estando presentes desde células bacterianas até de mamíferos e humanos. Em mamíferos os CLs podem ser encontrados em diversos tipos celulares, como os adipócitos, hepatócitos e nas células do sistema imune (MELO, R.C.N; WELLER, P.F., 2016).

Ultraestruturalmente, os CLs são reconhecidos por apresentarem aspecto homogêneo com elétrondensidade elevada, e a presença de um sistema de membranas interno altamente elaborado e compartimentalizado. Imagens de tomografia mostraram que essas organelas possuem um sistema de endomembranas organizado em redes tubulares semelhantes àqueles vistos no RE (Figura 6)(MELO, R.C.N.; WELLER, P.F., 2016). A biogênese completa do corpúsculo lipídico, bem como sua origem ainda não é completamente compreendida, mas estudos recentes apontam a origem dessas organelas a partir do RE, onde estão localizadas as enzimas que participam da síntese de triacilgliceróis e éter de esteróis(GAO, 2019).

No passado, os CLs foram amplamente associados a reserva de lipídios para metabolismo energético das células. Entretanto, atualmente estas organelas vêm sendo reconhecidas como dinâmicas e funcionalmente ativas, envolvidas em uma variedade de funções como metabolismo lipídico, tráfego e sinalização celular(MELO, 2011). Além disso, são capazes de tamponar quantidades celulares de lipídios potencialmente tóxicos, prevenindo assim a lipotoxicidade e o desencadeamento de estresse oxidativo. Podem produzir também os mediadores lipídicos que participarão do processo inflamatório(OLZMANN; P., 2019).Os CLs podem se associar e coordenar diferentes funções com outras organelas celulares. Por exemplo, interações entre CLs e mitocôndrias são bastante relatadas e estão envolvidas na coordenação para desempenho do metabolismo energético e de lipídeos da célula.

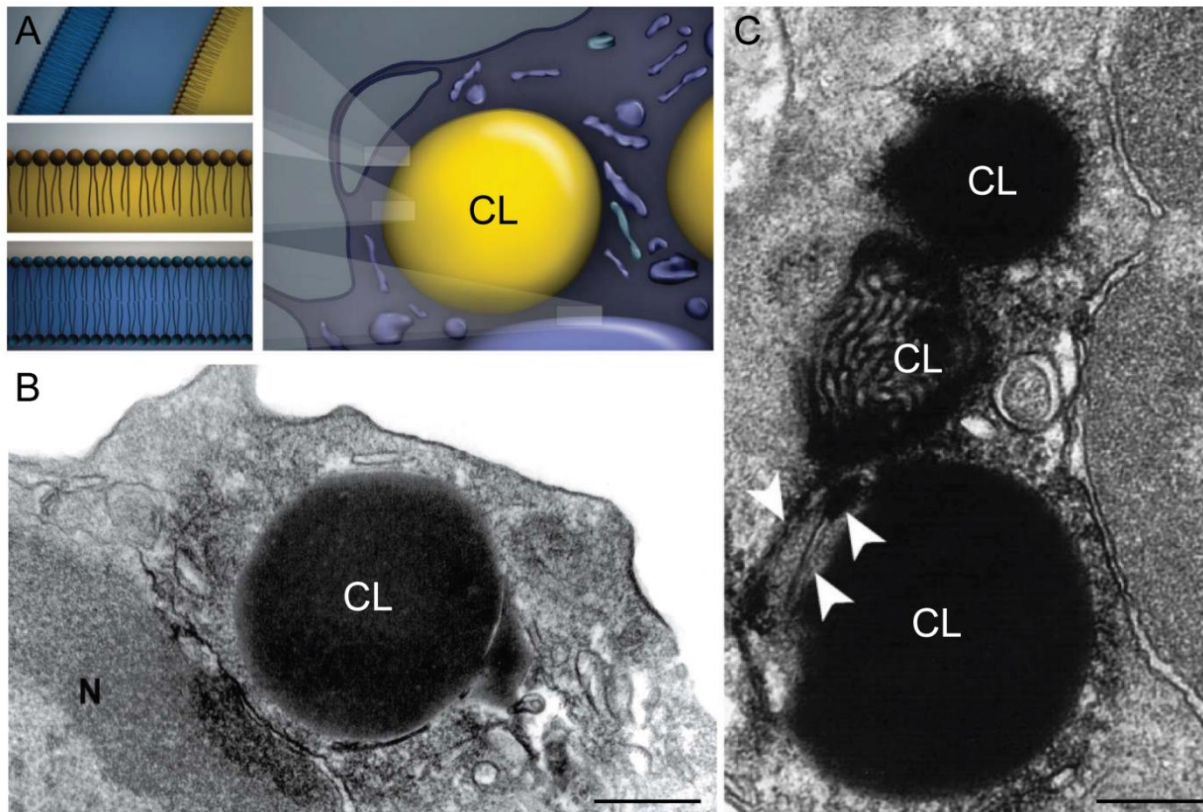


Figura 8- Ultraestrutura de Corpúsculos Lipídicos. Os corpúsculos lipídicos (CL) têm uma arquitetura única. (A) Eles são delimitados por uma monocamada de fosfolipídios que difere da organização estrutural clássica (membrana de bicamada de fosfolipídios) de todas as outras organelas, vesículas citoplasmáticas e membrana plasmática. (B) Visão de um CL dentro de um eosinófilo de sangue humano por microscopia eletrônica de transmissão convencional. N, núcleo. Essas organelas estão presentes nas células com papel relevante no metabolismo lipídico em contextos homeostáticos e capazes de tamponar subprodutos do metabolismo que levariam célula ao estresse oxidativo em contextos inflamatórios. Note duas morfologias típicas de CL. Um extremamente elétron-denso e outro no qual se pode observar o sistema de endomembranas. Barra=0,5 μ m. Adaptado de (MELO; D'AVILA; WAN; BOZZA *et al.*, 2011)

2.1.7 Funções de Eosinófilos

Estudos recentes apontam questionamentos a respeito do papel de eosinófilos meramente como células efetoras do processo inflamatório, apontando para um papel multifuncional, exercendo diversos papéis no organismo que vão desde a contribuição para o desenvolvimento de órgãos e tecidos ao qual estão relacionados, até a capacidade de remodelação e reparo desses mesmos tecidos.

2.1.7.1 Remodelação e Reparo Tecidual

Células e tecidos sofrem danos e injúrias devido a estresses fisiológicos, invasão de microrganismos e mudanças estruturais. Na tentativa de reestabelecer a homeostase, as células imunes migram até os locais danificados e iniciam o reparo e remodelamento tecidual, o que pode ser feito pela quebra e reforma da matriz

extracelular, diferenciação de células e alteração da proporção renovação/apoptose celular. Essa sequência de eventos se inicia com sinalizadores químicos como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e liberação de ROS que estimula o recrutamento de diversas células (JACOBSEN, 2012).

Nos eosinófilos humanos a capacidade de detectar danos ao tecido ocorre com auxílio de vários tipos de receptores histamínicos (HR1, HR2 e HR4), que associados à sinalização local faz com que haja recrutamento dos eosinófilos a localidade que sofreu injúria com consequente liberação de estímulos capazes de reparar os danos e remodelar os tecidos (REHER, 2012). Esses estímulos variam de acordo com o tecido. No epitélio humano, bem como nas vias aéreas os principais estímulos para reparação tecidual é a produção de fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (LEVI-SCHAFFER, 1999). e o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (STENFELDT; WENNERÅS, 2004) pelos eosinófilos. Em hepatócitos murinos, no entanto a produção de IL-4 é o principal fator produzido por eosinófilos para induzir a regeneração (GOH, 2013).

Algumas outras moléculas como fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também podem ser produzidas por eosinófilos e requeridas por alguns tecidos para reparação tecidual (WEN; ROTHENBERG, 2017).

2.1.7.2 Apresentação de Antígenos

Embora ainda pouco compreendida e recente, alguns estudos apontam para a capacidade de eosinófilos de apresentar antígenos, embora reduzida quando comparadas a outras células como macrófagos (CHUSID, 2018; SHI, 2004).

Eosinófilos tratados com GM-CSF *in vitro* apresentam capacidade de apresentação de antígeno induzindo expansão clonal de células T contra Staphylococcal (MAWHORTER, 1994). Foi observada também a expressão de todo o conjunto de moléculas e receptores necessários ao processo de apresentação de antígenos incluindo moléculas de complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) CD80, CD86, CD9, CD28 e CD40 nesses eosinófilos (AKUTHOTA, 2012; SHI, 2004; SHI, 2000)

Foi visto ainda que a proliferação de células T é significativamente aumentada em presença de IL-5, que possui papel chave na maturação, desenvolvimento e diferenciação de eosinófilos conferindo a essa citocina, portanto, um papel potencializador na capacidade de eosinófilos apresentarem antígenos (MAWHORTER, 1994).

Em humanos foi demonstrado que em algumas condições como alergias e esofagite eosinofílica, eosinófilos apresentam antígenos a células T nas vias aéreas e no trato gástrico, respectivamente, desses pacientes, sendo identificada a presença de MHC II expressa nessas células. Essa apresentação de antígenos é responsável pelo início da cascata inflamatória nessas condições referidas (JUNG, 2008; SHI, 2004).

2.1.7.3 Imunomodulação

Até então vistos apenas como células que exacerbam e mantém o processo inflamatório, estudos recentes apontam eosinófilos como células imunomoduladoras, para linfócitos T e B (JACOBSEN, 2007). Em relação ao primeiro, estudos fornecem evidências da redução da liberação de citocinas de perfil Th2 e do recrutamento de células T para o pulmão de camundongos nocaute para eosinófilos, apontando um papel crítico dessa célula no recrutamento linfocítico para o sítio pulmonar, levando esses animais à exacerbação de produção de muco e a hiper-reatividade de vias aéreas. Em humanos, foi observada a redução do desenvolvimento da Placa de Payer no intestino de indivíduos com eosinofilia devido ao déficit no recrutamento de linfócitos T helper (WEN; ROTHENBERG, 2017).

Além disso, foi visto recentemente que eosinófilos murinos se localizam com linfócitos B na medula óssea e fornece citocinas como IL-6 e IL-17, que são essenciais para a diferenciação, manutenção e desenvolvimento de células B em plasmócitos. Além disso, eosinófilos contribuem para a manutenção constante de secreção de imunoglobulina A (IgA) por plasmócitos intestinais contribuindo para manutenção da imunidade da mucosa intestinal (CHU; BEREK, 2012; CHU; BEREK, 2013).

Em eosinófilos humanos as proteínas estocadas nos grânulos podem induzir ativação celular de forma autócrina e/ou parácrina ao se ligar a receptores de reconhecimento de padrão para controle da homeostase (JACOBSEN, 2012) Em

contextos de doenças como a asma, eosinófilos humanos são capazes de secretar interleucinas como IL-4, juntamente com um conjunto de citocinas e quimiocinas que ativam células endoteliais e epiteliais do sistema respiratório e são atrativas para mastócitos em sítios de ativação da resposta asmática (HOGAN, 2008; ROSENBERG, 2013).

2.1.7.4 Homeostase

Eosinófilos possuem funções teciduais para além do papel efetor no processo inflamatório. Tais funções estão relacionadas ao sistema reprodutor feminino, cujo papel dos eosinófilos é relevante na manutenção do ciclo menstrual, sendo encontrado em quantidades consideráveis no útero e mama em condições homeostáticas, nas quais a liberação de CCL11 parece estar relacionada ao estímulo estrogênico. No tecido adiposo desempenham papel na remodelação e na deposição do tecido (CHUSID, 2018).

Além disso, eosinófilos desempenham papéis homeostáticos no timo, pulmão, trato gastrointestinal, onde possui estrita relação com o desenvolvimento da microbiota e vários outros tecidos de mucosa. Esses órgãos possuem recrutamento de eosinófilos ainda no período pré-natal, o que aponta para uma função dessa célula no desenvolvimento e maturação dos mesmos (SHAH, 2020)

2.1.8 Eosinófilos e Hipereosinofilia

Embora muitas formas de SHE permaneçam idiopáticas, as etiologias de duas categorias de SHE foram elucidadas e são referidos como uma variante linfocítica de SHE, e SHE "mieloproliferativo" (SIMON, 2010). HES variantes linfocíticas são devidos a clones aberrantes de células T que podem superproduzir IL-5 que, e, conduz a hipereosinofilia. Variantes "mieloproliferativas" de HES são formas de leucemia eosinofílica crônica são devidas a uma das muitas translocações cromossômicas possíveis (LEFÈVRE, 2014). A mais prevalente dessas translocações cromossômicas envolvem o gene que codifica o receptor de tirosina quinase, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) alfa, que pode estar implicado em translocações com vários parceiros de fusão. Entre estes, a translocação mais comum produz uma proteína de fusão combinando um domínio semelhante a FIP1L1 com um domínio PDGF alfa que produz a proteína FIP1L1-PDGFR α , uma tirosina constitutivamente ativa receptora de quinase (LEGRAND, 2013).

Clinicamente, essa síndrome é definida a partir de uma contagem absoluta de eosinófilos que seja maior que 1.500 eosinófilos/ μ L (KLION, 2020). Nessa condição, portanto, os eosinófilos se mostram naturalmente ativados, constituindo um bom modelo de estudo para investigar as funcionalidades dessa célula (MELO, 2009).

O critério de classificação dos subtipos clínicos de hipereosinofilia tem como base a origem da eosinofilia que pode ser primária, secundária ou mesmo desconhecida. Tais subtipos são associados a características clínicas da doença que pode ser sistêmica como no caso do hipereosinofilia sanguínea ou restrita ao órgão (tecidual) como no caso da hipereosinofilia na pele (KHOURY, 2017). Pode ocorrer ainda em contextos específicos como em reações de hipersensibilidade a drogas, infecção por helmintos e neoplasia, para os quais o tratamento específico da causa secundária leva à resolução da eosinofilia, o que é chamado de hipereosinofilia associada (KLION, 2020).

2.2 MITOCÔNDRIAS

2.2.1 Aspectos Gerais

Mitocôndrias são organelas citoplasmáticas altamente dinâmicas envolvidas em diversos processos celulares, exibindo extensa plasticidade de fenótipos. Foram descobertas pela primeira vez em 1890, em células de fígado e rim pelo patologista Richard Altmann com o uso da microscopia de luz, (ALTMANN, 1890) sendo chamadas inicialmente de *bioblasts*. Em 1898, o termo mitocôndria foi cunhado pelo médico Carl Benda (BENDA, 1898) e, com o advento da microscopia eletrônica de transmissão (MET) no século XX, os primeiros estudos ultraestruturais na década de 1950 revelaram os aspectos morfológicos característicos das mitocôndrias amplamente conhecidos (AGAR; DOUGLAS, 1957). Ainda assim, alguns aspectos da mitocôndria como a sua origem permaneciam incompreendidos naquela época. Com os estudos de Lynn Margulis em 1967, a origem evolutiva dessas organelas foi elucidada a partir da constatação de que são capazes de produzir parte de suas proteínas com seu próprio material genético que se manteve conservado evolutivamente de sua origem bacteriana (SAGAN, 1967)

Inúmeros estudos posteriores mostraram que as mitocôndrias são organelas compartimentalizadas, preenchidas pela matriz mitocondrial, onde estão dissolvidas

as cadeias de DNA, ribossomos, pequenos grânulos e as enzimas necessárias para o processo de respiração aeróbica, além de uma grande quantidade de proteínas exercendo as mais diversas funções Mills, 2017 #40}.

2.2.2 Ultraestrutura

As mitocôndrias possuem ultraestrutura complexa, sendo delimitadas por uma dupla membrana lipídica, com dobramentos da membrana interna formando as estruturas conhecidas como cristas, que apresentam número e forma variáveis nos diversos tipos celulares, e um espaço entre as cristas onde se localiza a matriz mitocondrial (Figura 9)(DETMER; CHAN, 2007)

As membranas mitocondriais diferem-sena composição lipídica sendo funcional e estruturalmente diferentes apresentando baixas proporções de fosfolipídio para proteína e esterol em comparação com outras frações subcelulares. Da composição fosfolipídica total a fosfatidilcolina e fostadiletanolamina são os principais fosfolipídios que respondem por cerca de 80% de fosfolipídios totais, com esteróis e esfingolipídeos encontrados apenas em quantidades baixas (HORVATH; DAUM, 2013)

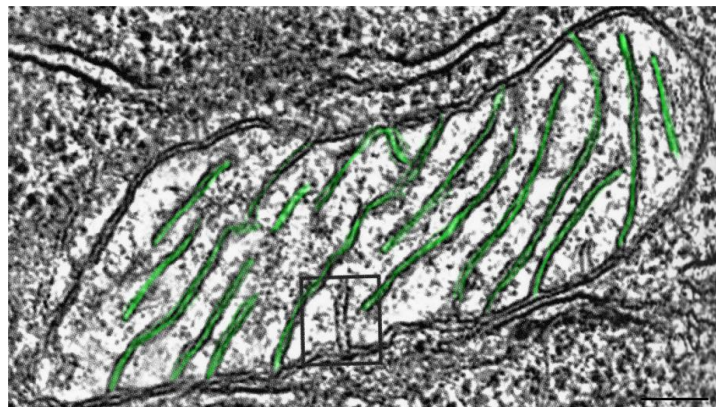


Figura 9- Aspecto Ultraestrutural de Mitocôndrias. Mitocôndrias possuem uma membrana dupla característica. A membrana interna possui invaginações que dão origem as cristas mitocondriais (marcadas em verde). Essas cristas podem variar em formato, o que constitui um mecanismo de adaptação metabólica, de acordo ao contexto em que a mitocôndria está inserida. Tais cristas estão imersas em uma matriz onde ocorre muitos dos processos metabólicos que a mitocôndria realiza. Note no detalhe o septo, formada após a fusão de mitocôndrias. Barra=2cm. Adaptado de (MELO, 2018)

2.2.3 Funções Mitocondriais

Mitocôndrias são organelas altamente versáteis envolvidas em uma infinidade de processos essenciais que podem tanto envolver o restabelecimento e a manutenção da homeostase celular como também o desencadeamento de disfunções que causam danos e, em casos mais severos a morte celular (Figura 10).

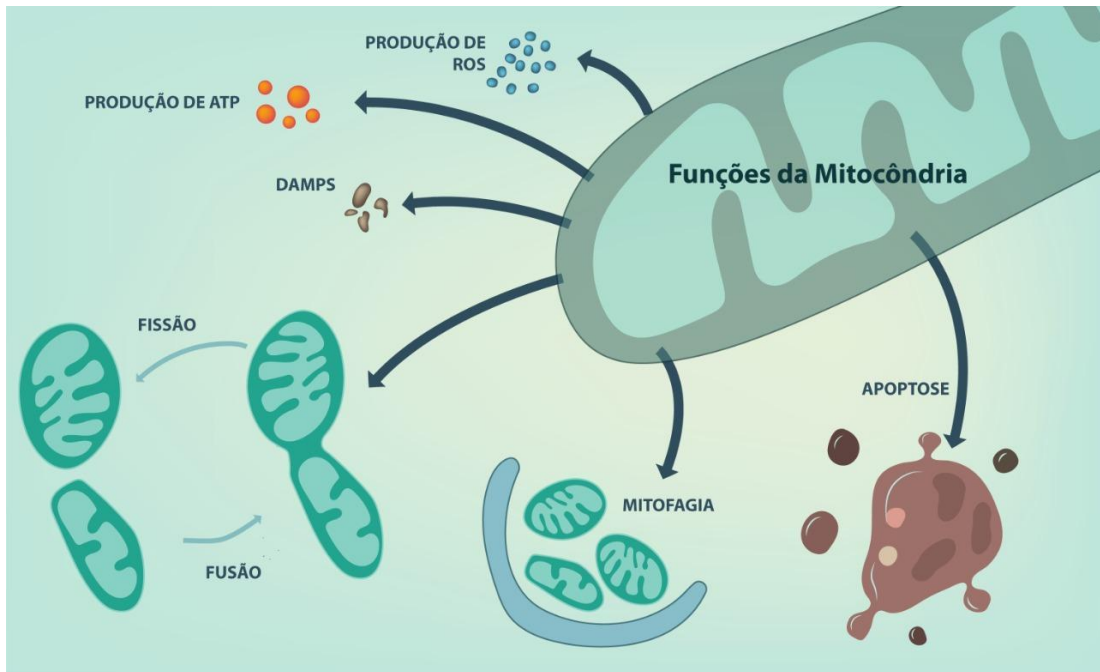


Figura 10- Funções Mitocondriais. As principais funções desempenhadas pelas mitocôndrias envolvem processos de produção de ROS e de ATP, geração de DAMPS, fissão, fusão, mitofagia e apoptose.

2.2.3.1 Mitocôndrias e Respiração Celular

A respiração celular corresponde à função mais amplamente conhecida que as mitocôndrias realizam, caracterizada pela extração de energia dos nutrientes com consequente armazenamento na forma de ATP. Ocorre em três etapas: glicólise, que ocorre na matriz mitocondrial, na ausência de oxigênio, na qual a glicose é degradada, ciclo de Krebs, realizada na matriz mitocondrial, corresponde à etapa na qual ocorre a produção de prótons e elétrons que serão responsáveis pela geração de energia na etapa subsequente, a fosforilação oxidativa, que corresponde a sequência de eventos que resulta na produção de ATP (AGRAWAL; MABALIRAJAN, 2016)

2.2.3.2 Mitocôndrias e Morte Celular

A morte celular programada com perfil morfológico de apoptose, ocorre em decorrência de desequilíbrios homeostáticos causados por fatores externos como a

presença de patógenos e privação de oxigênio e nutrientes, bem como por desregulação interna da produção de proteínas e outras moléculas essenciais à sobrevivência e manutenção celular. Esse processo é essencial para manutenção do funcionamento normal do organismo, uma vez que evita danos e lesões teciduais.

A mitocôndria está envolvida na ativação da via intrínseca da apoptose, que envolve a ativação de uma cascata de moléculas, em uma sequência de eventos orquestrados que culminam na morte celular. Primeiramente ocorre a ativação de proteínas da família BH3, que contém um conjunto de proteínas pró-apoptóticas como BAX e BAK. Esse processo causa uma alteração na permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, que corresponde ao ponto chave para ocorrência de apoptose, uma vez que tendo ativado essas alterações o processo de apoptose se torna irreversível (DEWSON, 2001). Em seguida, devido à alteração da permeabilidade, a mitocôndria libera citocromo C no citoplasma, uma molécula que em condições homeostáticas desempenha papel relevante no funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, mas ao ser liberada durante a ativação do processo apoptótico passa a desempenhar um papel sinalizador da ocorrência do evento no citoplasma, estimulando a formação do complexo apoptossômico, um complexo proteico que executa as etapas finais do processo de morte (ILMARINEN, 2014).

Ao ser formado, o apoptossomo transforma a pró-caspase9 em caspase-9, uma proteína crucial para a consolidação do evento apoptótico, ativando as caspases 3 e 7, que vão coordenar a sequência de eventos de decomposição dos produtos celulares, com destaque para a caspase 3 que promove a quebra do DNA celular (ILMARINEN, 2014).

2.2.3.3 Mitocôndrias e Regulação de Íons Cálcio

Vários estudos têm mostrado uma forte relação entre cálcio e mitocôndria tanto durante condições fisiológicas quanto fisiopatológicas (GUNTER, 2000). Estresses do RE geram indução de efluxo de cálcio para o citoplasma que é regulado de maneira homeostática pelas mitocôndrias, uma vez que elas atuam tamponando esses íons que ficam dispersos pelo citoplasma. Quando as mitocôndrias não conseguem mais realizar esse tamponamento, ao atingirem o ponto de saturação, começam a sofrer alteração da permeabilidade de suas membranas levando a um inchaço irreversível, desacoplamento e perda de conteúdo mitocondrial. A deficiência funcional de cálcio e

sua relação com a dinâmica mitocondrial são agora entendidos desempenhando um papel na patogênese de muitas doenças não, como demência, Alzheimer, epilepsia, Parkinson, cardiomiopatia, doença arterial coronariana, síndrome da fadiga crônica, retinite pigmentosa, diabetes e, mais importante, câncer. Os mecanismos moleculares de regulação mitocondrial ainda não são completamente compreendidos (VERMA, 2011).

2.2.3.4 Mitocôndrias e Metabolismo Lipídico

O metabolismo lipídico mitocondrial desempenha um papel central na regulação de diversas vias de sinalização, como estresse oxidativo, autofagia celular, autofagia seletiva para mitocôndrias (mitofagia), ferroptose, piroptose, apoptose e necroptose, no desenvolvimento de toxicidade celular, doenças crônicas e distúrbios do metabolismo. Os lipídios celulares sofrem um processo denominado de β -oxidação mitocondrial que contribui tanto para a produção direta de ATP, quanto para a produção de corpos cetônicos para a geração secundária de ATP pelos tecidos periféricos que gera aproximadamente 80% do ATP necessário para órgãos como o fígado e o coração. Inibições nessa via podem levar a doenças como esteatose hepática. (JAIN, 2020; ROGERS, 2014; WANG, 2020)

2.2.3.5 Mitofagia

A mitofagia é o processo de autofagia mitocondrial que consiste na remoção de mitocôndrias danificadas, que ocorre por privação de nutrientes e oxigênio, por excessiva modificação do meio que leva a despolarização da membrana mitocondrial ou por desbalanço na proporção de alguns componentes essenciais para a realização da respiração celular (MURPHY, 2013)

Esse processo protege a célula da liberação de proteínas pró-apoptóticas, da geração de ROS e do bloqueio da hidrólise de ATP. Inicialmente ocorre a formação de membranas autofagossômicas que removem mitocôndrias com DNA mitocondriais danificados e/ou despolarizadas (LEMASTERS, 2014).

O envolvimento dessas mitocôndrias pela membrana é feito individualmente e o autofagossomo passa a ser denominado mitofagossomo. Esse compartimento se funde ao lisossomo para ser degradado. O balanço entre o processo de mitofagia e a biogênese mitocondrial está diretamente associado à manutenção da homeostase

celular e já foi visto que uma ruptura nesse processo esta associado ao desenvolvimento de algumas patologias cardíacas e neuronais (LEMASTERS, 2014).

2.2.3.6 Mitocôndrias e Produção de ROS

As mitocôndrias são uma fonte importante de ROS dentro da maioria das células de mamíferos. Esse acúmulo é favorecido pelo desbalanço na proporção da produção de NADH/NAD⁺ e gera estresse oxidativo aos quais as células respondem ativando vários mecanismos de defesa (SCHERZ-SHOVAL; ELAZAR, 2007)

Essa produção e acúmulo de ROS contribuem para o dano mitocondrial em uma gama de patologias e também é importante na sinalização oxirredutora da organela para o resto da célula. Em níveis baixos, entretanto, as ROS atuam como moléculas sinalizadoras em vários processos intracelulares (MURPHY, 2013) como a indução da apoptose (SIMON, 2000)}, o controle de autofagia (SCHERZ-SHOVAL; ELAZAR, 2007), a ativação de células T (MURPHY; SIEGEL, 2013) e a ativação do processo de formação de inflamassoma em resposta a uma série de estímulos (CLOONAN; CHOI, 2012)

2.2.3.7 Padrões Moleculares Relacionados a Dano (DAMP)

O sistema imunológico inato evoluiu para reconhecer moléculas bacterianas conservadas que são estranhas às células hospedeiras. Dada à história evolutiva das mitocôndrias, consideradas originadas de α -proteobactérias por meio de endossimbiose (ARCHIBALD, 2015), foi levantada a hipótese de que os constituintes mitocondriais possam funcionar como reguladores das respostas imunológicas e inflamatórias inatas, sendo capazes de atuar como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) durante insultos patológicos (CLOONAN; CHOI, 2013; KRYSKO, 2011).

Esse processo ocorre quando as mitocôndrias estão estressadas ou apresentam comprometimento funcional, e passam a produzir uma variedade de DAMPs mitocondriais também conhecidos como alarminas mitocondriais, podendo se tornar pró-inflamatórios e iniciar respostas imunes inatas e adaptativas ao ativar a superfície celular e os receptores intracelulares. Essa liberação descontrolada e excessiva de DAMPs mitocondriais está associada à gravidade e tem valor prognóstico em doenças humanas o que leva ao desencadeamento de processos

inflamatórios e autoimunes, bem como em doenças isquêmicas do coração e câncer (CRUZ; KANG, 2018; NAKAHIRA, 2015).

As principais moléculas liberadas como DAMP são: a cardiolipina, que induz a formação de inflamassomas em macrófagos, pois também está presente na parede celular de bactérias sendo sequestrada pelo sistema imune para iniciar uma cascata de sinalização pró-inflamatória; o succinato, que é capaz de induzir a ligação de LPS ao seu receptor e induzir a formação de uma cascata pró-inflamatória em células dendríticas; citocromo C, cuja liberação está associada à ativação de NF- κ B que é capaz de ativar monócitos e neutrófilos em contextos inflamatórios e o DNA mitocondrial, que é capaz de estimular a ativação de INF e iniciar uma cascata pró-inflamatória (CRUZ; KANG, 2018). Recentemente foi visto que essas moléculas são detectadas em diferentes fluidos corporais humanos, sugerindo seu uso potencial como biomarcadores para muitas doenças (GRAZIOLI; PUGIN, 2018; RONGVAUX, 2018).

2.2.4 Aspectos da Dinâmica Mitocondrial

As primeiras observações a respeito da dinâmica mitocondrial foram feitas por Lewis e Lewis em 1914. Eles observaram que as mitocôndrias podem sofrer transformações conformacionais de qualquer tipo ou mesmo se fundirem com outras mitocôndrias ou se dividirem (ARCHER, 2013) (LEWIS; LEWIS, 1914). Entretanto, apenas na década de 1960, foi comprovado que esse comportamento mitocondrial é fundamental para a fisiologia da célula. Foi observado que a conversão da energia química do transporte de elétrons em trabalho mecânico e vice-versa, bem como o aporte de moléculas, nutrientes e taxa de consumo de oxigênio (O_2), são capazes de induzir mudanças conformacionais que levam a alterações morfológicas (HACKENBROCK, 1968). A partir de então diversos aspectos mitocôndriais passaram a ser investigados na tentativa de melhor compreender a função dessas organelas na fisiologia celular.

Recentemente, surgiram estudos que apontam a participação dessas organelas nas vias de sinalização intracelular, com capacidade de se modular para executar funções celulares adequadas (BHOLA; LETAI, 2016; CRUZ; KANG, 2018), como é o caso da fissão e fusão mitocondrial que regulam aspectos como a

homeostase do cálcio, a geração de ATP e de ROS, a progressão do ciclo celular, apoptose e a mitofagia (ARCHER, 2013).

As mitocôndrias mudam continuamente de forma por meio das ações combinadas de fissão, fusão e movimento ao longo das trilhas do citoesqueleto. Os comprimentos das mitocôndrias e o grau em que eles formam redes fechadas são determinados pelo equilíbrio entre as taxas de fissão e fusão. Essas taxas são influenciadas por condições metabólicas e patogênicas dentro das mitocôndrias e pelo ambiente intracelular. Suas funções são controladas por diferentes conjuntos de adaptadores de proteínas na superfície das mitocôndrias e por uma série de processos regulatórios .(VAN DER BLIEK, 2013).

A frequência de ocorrência desses processos bem como o equilíbrio entre as taxas de fissão e fusão são essenciais para manutenção da saúde das células (CLOONAN; CHOI, 2016), enquanto as disfunções e falhas nesse processo estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças, principalmente em patologias neurais e cardíacas.(ARCHER, 2013).

No meio dessas novas descobertas um novo aspecto foi encontrado; a geração de pequenos portadores vesiculares que transportam proteínas mitocondriais e lipídios para outras organelas intracelulares corresponde a uma das quatro vias de controle de qualidade mitocondrial. Essas vesículas derivadas de mitocôndrias (VDM's) foram inicialmente encontradas no transporte de uma proteína da membrana externa mitocondrial para uma subpopulação de peroxissomos. No entanto, outros VDM's não tiveram como alvo os peroxissomos e, em vez disso, se fundiram com o endossomo tardio, ou corpo multivesicular. VDM's são geradas por meio da incorporação seletiva de cargas de proteínas, que podem ser limitadas à membrana externa, ou podem incluir membrana externa, interna e conteúdo da matriz. A análise ultraestrutural revelou que seu tamanho é relativamente uniforme, entre 70 e 150 nm ,(SUGIURA, 2014).

2.2.4.1 Mitocôndria em Células do Sistema Imune

O papel mitocondrial nas células imunes sempre foi relacionado ao controle e suporte às necessidades metabólicas biossintéticas e bioenergéticas da célula. No entanto, nas últimas décadas foi reconhecido seu papel no desencadeamento de respostas imunes. Foi demonstrado que as mitocôndrias participam de diversas vias

imunológicas inatas, funcionando como plataformas de sinalização e contribuindo para respostas efetoras. Como é o caso da regulação da sinalização antiviral, fornecendo ATP e ROS, que são moléculas importantes na resposta imune inata e ao dano e ao estresse celular em decorrência de infecção .(MOHANTY, 2019; RONGVAUX, 2018; WEST, 2011).

Essas organelas também são capazes de controlar o destino da célula imunológica, bem como seus processos de diferenciação e regulação da sobrevivência através de mudanças na forma mitocondrial pelos eventos da dinâmica mitocondrial. Esses eventos incluindo fusão e fissão, tamanho e localização associado a modificações na arquitetura e organização das cristas, tem papel na regulação da função das células T, na diferenciação das linhagens de macrófagos M1 e M2, na ativação de inflamassomas e na montagem de armadilhas de DNA extracelulares em neutrófilos (ANGAJALA, 2018; GAO, 2019; MEHTA, 2017).

2.2.4.2 Mitocôndrias em Eosinófilos

Os eosinófilos enfrentam mudanças constantes em seu microambiente, pois essas células precisam ser capazes de migrar e dessa forma adaptar sua maquinaria metabólica a exigência celular e ambiental. Recentemente foi visto que o metabolismo dessas células é muito maior em flexibilidade em comparação aos neutrófilos, com potencial para usar glicólise, oxidação de glicose, e fosforilação oxidativa, diferentemente dos neutrófilos que só utilizam as duas primeiras. Essa flexibilidade permitiu que os eosinófilos se adaptassem melhor a diversos papéis como na defesa do hospedeiro, homeostase e imunomodulação(PORTER, 2018).

Além disso, as mitocôndrias são as organelas que determinam o destino da célula através da fusão de sinais pró e anti-apoptóticos, sendo, portanto, essenciais na mediação da apoptose, bem como para a sinalização de sobrevivência em eosinófilos. Esse processo requer o auxílio de alguns metabólitos mitocondriais como o óxido nítrico (NO) que está envolvido em várias etapas, desde a resposta inicial ao estresse até a perda do potencial de membrana mitocondrial .(ILMARINEN, 2014; PEACHMAN, 2001)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar diferentes aspectos da ultraestrutura mitocondrial de eosinófilos humanos imaturos, maduros e ativados na Síndrome de Hipereosinofilia (SHE).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar aspectos diferenciais da morfologia mitocondrial durante a maturação de eosinófilos imaturos em culturas;
- Caracterizar o perfil mitocondrial de eosinófilos humanos isolados do sangue periférico não estimulados;
- Estudar a ultraestrutura das mitocôndrias de eosinófilos do sangue periférico e teciduais (pele) envolvidos na SHE;
- Avaliar aspectos quantitativos mitocondriais (número, forma, área, morfologia e densidade de cristas), assim como potenciais interações de mitocôndrias com outras organelas nas condições acima;
- Identificar possíveis características determinantes e discriminantes das mitocôndrias de eosinófilos na SHE.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e Cultura de Eosinófilos do Cordão Umbilical

A cultura de eosinófilos humanos foi estabelecida conforme (DVORAK, 1989). Brevemente, células mononucleares foram isoladas de sangue coletado de cordão umbilical humano heparinizado (Ficoll Hypaque; 1,077 mg/ml; Pharmacia, Piscataway, NJ). Posteriormente, estas células ($\approx 5 \times 10^6$ células/mL) foram re-suspensas em placas de cultura celular (24 poços) com meio RPMI suplementado (FBS [10%], 2-mercaptoetanol [50 μ m/mL], L-glutamina [2 mmol/L], Penicilina [100 U/mL], Estreptomicina [50 μ g/mL], Gentamicina [25 μ g/mL]) e enriquecido com rhlL-5 para diferenciação em linhagem eosinofílica. Metade do meio de cultura foi substituído semanalmente por meio fresco. Aos 35 dias, investigações por microscopia de luz mostraram que 70-90% das células em cultura estavam comprometidas com a linhagem eosinofílica. As células foram coletadas e processadas para MET, conforme descrito a seguir (Material e Métodos, Seção 4.4). As coletas de sangue do cordão umbilical foram realizadas no Beth Israel Medical Center (BIMC; Harvard Medical School, Boston, EUA), seguindo protocolos com aprovação do comitê de ética institucional

4.2 Coleta e Isolamento de Eosinófilos Maduros do Sangue Periférico

Amostras de sangue periférico de doadores humanos adultos saudáveis foram coletadas e os eosinófilos maduros isolados conforme anteriormente (MELO, 2009). As coletas foram realizadas no BIDMC (Harvard Medical School, Boston, EUA) e aprovadas por comitê de ética institucional informando consentimento de todos os doadores. Brevemente, os eosinófilos maduros foram isolados pelo método de seleção negativa para o enriquecimento e purificação das amostras, utilizando coquetel de enriquecimento (StemSep; StemCell Technologies, Seattle, WA, USA) em meio RPMI 1640 a 37°C por 1h. Foi feito ainda o procedimento de MACS *bead* (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), com exceção da etapa de lise hipotônica das hemácias para evitar qualquer efeito de sua lise sobre a função do eosinófilo. A viabilidade dos eosinófilos e pureza foram de mais de 99% como determinados pela incorporação de brometo de etídio (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) e amostras

centrifugadas e coradas com kit de HEMA, 3 (Fisher Scientific, Houston, TX, USA), respectivamente.

4.3 Obtenção de Eosinófilos de Pacientes com SHE

As amostras de sangue periférico e biópsia de pele foram obtidas de um paciente diagnosticado com hipereosinofilia idiopática com ausência de mutação para o fator Fip1-like 1 / fator de crescimento derivado de plaquetas- α (MELO, 2009). As amostras foram coletadas durante avaliações clínicas periódicas deste paciente no BDIMC (Harvard Medical School, Boston, EUA), com consentimento aprovado pelo comitê de ética institucional. Os eosinófilos foram isolados do sangue conforme anteriormente descrito na Seção 4.2 (Material e Métodos). As amostras de sangue e pele utilizadas no presente trabalho correspondem ao acompanhamento clínico do mesmo paciente, o que garante uma maior homogeneidade na variação genotípica e respostas dos eosinófilos analisados.

4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Células da cultura, eosinófilos isolados do sangue (saudável e SHE) e biopsias da pele (SHE) foram imediatamente fixadas em Karnovsky modificado (paraformaldeído 1% e glutaraldeído 1,25 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M; pH 7,4) por 1h em temperatura ambiente (TA), lavadas no mesmo tampão e centrifugadas a 400g por 10 min. As amostras foram então resuspendidas em agar 2% em tampão de cacodilato de sódio (0,1M; pH 7,4) e rapidamente centrifugadas (MELO, 2009). Os *pellets* resultantes foram mantidos no mesmo tampão a 4°C para processamento adicional. Os *pellets* de eosinófilos foram então pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% em tampão de Sym-Collidine (pH 7,4) por 2h em TA. Após lavar com tampão de maleato de sódio (pH 5,2) os *pellets* foram contrastados com acetato de uranila 2% em tampão de maleato de sódio 0,05M (pH 6,0) por 2h *in bloc* e lavado com o mesmo tampão antes da desidratação gradual em etanol. A infiltração e inclusão foram feitas em resina Epon (Ted Pella, Redding, CA, USA). Após polimerização a 60°C por 16h, secções ultrafinas das amostras foram feitas usando uma lâmina de diamante em um ultramicrótomo (Leica, Bannockburn, IL, USA). As secções foram montadas em grades de cobre (200-mesh; Ted Pella) e contrastadas com citrato de chumbo e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (P300; Philips, Eindhoven, The Netherlands).

4.5 Análises Ultraestruturais

Para os estudos da ultraestrutura geral e mitocôndrias de eosinófilos por MET, eletromicrografias foram aleatoriamente obtidas em aumentos de 2.600X a 13.000X. Foram analisadas um total de 300 secções celulares com quantificação realizada nas micrografias eletrônicas que mostravam secções transversais que apresentavam todo o perfil celular e o núcleo (Tabela 1). Eosinófilos maduros foram considerados com base nas características ultraestruturais de eosinófilos do sangue periférico saudável, que apresentaram (i) núcleo lobulado e (ii) presença de grânulos com cristaloide em diferentes proporções. Todos os eosinófilos das culturas do sangue de cordão umbilical (100%) apresentaram ausência destas duas características e foram considerados imaturos.

As mitocôndrias de eosinófilos imaturos, maduros e na SHE foram avaliadas ultraestruturalmente de forma individual e por secção celular. No total foram avaliadas 1516 mitocôndrias (Tabela 1). Todas as análises morfométricas e quantitativas foram realizadas com auxílio do programa Fiji 1.53c (Image J; National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Os parâmetros analisados das mitocôndrias são descritos a seguir (Seção 4.5.2).

Tabela 1: Número total de células e mitocôndrias por amostra que foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Amostra	Células (N)	Mitocôndrias (n)
Cultura de eosinófilos do sangue do cordão umbilical	30	172
Eosinófilos isolados do sangue [saudável]	27	204
Eosinófilos isolados do sangue [SHE]	26	148
Eosinófilos da pele [SHE]	24	247

4.5.1 Distribuição e Aspectos Ultraestruturais das Organelas Celulares

Inicialmente, em eosinófilos imaturos e maduros, foram mensuradas a área total das células e área citoplasmática ocupada por RER, Golgi, Mitocôndrias, Grânulos específicos e núcleo. Aspectos qualitativos da morfologia nuclear também foram avaliados. Em paralelo, todos os grânulos foram avaliados em eosinófilos maduros e imaturos. Assim, as diferentes populações de grânulos imaturos (inicial e tardio, Figura 4) e maduros (intactos e mobilizados, Figura 4) foram caracterizadas com base em aspectos gerais dos grânulos, como elétrons-densidade da matriz, presença de cristaloide e conteúdos membranosos.

4.5.2 Quantidade de Mitocôndrias no Citoplasma de Eosinófilos

A quantidade de mitocôndrias no citoplasma das células está diretamente associada com a distribuição dessa organela bem como ao seu nível de atividade. Para avaliação da quantidade de mitocôndrias nos eosinófilos foram estabelecidos:

1)	Número de mitocôndrias por μm^2 de citoplasma	$= 1 / ((\text{ATC} - \text{Anu}) / \text{N}_{\text{mi}})$
2)	Área de mitocôndrias por μm^2 de citoplasma	$= 1 / ((\text{ATC} - \text{Anu}) / \text{A}_{\text{mi}})$

Onde, **N_{mi}** = o número de mitocôndrias por seção celular; **ATC** = área total de cada seção celular; **Anu** = área do núcleo de cada seção celular e **A_{mi}** = área citoplasmática ocupada por mitocôndrias.

4.5.3 Análises Quantitativas de Mitocôndrias de Eosinófilos

Para avaliação do tamanho das mitocôndrias, foi medida a área individual de cada uma dessas organelas em cada seção celular. Desta forma, foi estabelecida a média da área (nm^2) de mitocôndrias por grupo analisado.

A circularidade é um descritor de forma que considera uma função da área e do perímetro [Circularidade = $(4 \times \pi) \times (\text{Área} / \text{Perímetro}^2)$] e ajusta cada objeto a um círculo perfeito e mede seu desvio. Considerando que as mitocôndrias são organelas plásticas que podem variar seu formato em mais ou menos circulares ou elípticos, a circularidade é frequentemente avaliada e pode variar dependendo da condição a qual uma célula está submetida (BYRNE, 2019; GARCIA, 2018; PICARD, 2013; SANTOS-ALVES, 2015). Um valor de circularidade de 1 indica um círculo perfeito, enquanto

valores menores e mais próximos de 0 indicam um alongamento da morfologia mitocondrial. Assim, foram medidas a circularidade das mitocôndrias dos eosinófilos em cada condição (maduro, imaturo e SHE).

4.5.4 Morfologia e Número das Cristas Mitocondriais

As mitocôndrias foram divididas em três padrões morfológicos distintos com relação ao aspecto da maioria de suas cristas: (1) lamelar, que apresentavam cristas distribuídas paralelamente, em forma de “prateleiras”, ou (2) tubular, que possuíam um padrão na qual as cristas constituem pequenos círculos dispostos na matriz e (3) mistos/sem padrão, na qual as mitocôndrias apresentavam cristas lamelares e tubulares simultaneamente, ou não se pode precisar qual o aspecto padrão que as cristas apresentavam.

Para avaliação da densidade de cristas mitocondriais, as cristas de cada mitocôndria apresentando padrão lamelar foram quantificadas. Posteriormente foi estabelecida a proporção de mitocôndrias apresentando alta (>5) ou baixa (1-4) densidade de cristas.

4.5.5 Interações de Proximidade das Mitocôndrias com Outras Organelas

As mitocôndrias são organelas dinâmicas capazes de alterar seu posicionamento no citoplasma das células e estabelecer interações funcionais de proximidade e contato com diversos micro domínios moleculares e com outras organelas (ANTONICKA, 2020). Desta forma, foram realizadas análises das interações de proximidade e contato que as mitocôndrias faziam com diferentes organelas (RER, Golgi, outras mitocôndrias, CLs, Grânulos) nos eosinófilos humanos imaturos, maduros e na SHE. Análises morfométricas de proximidade das organelas em relação as mitocôndrias foram realizadas individualmente para cada mitocôndria e em cada secção celular. Para isso, inicialmente foi estabelecido um quadrante radial a partir do centro da mitocôndria analisada que apresentava duas vezes o seu diâmetro (Figura 9). Em seguida, todas as organelas que estavam dentro deste quadrante radial (i.g. zona de proximidade) foram computadas. Organelas que apresentavam contato físico com a mitocôndria foram também discriminadas.

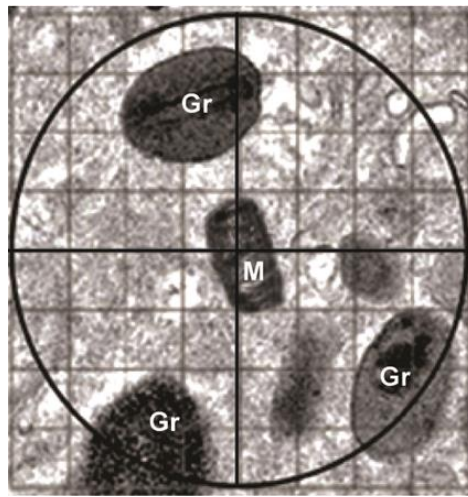


Figura 11- Quadrante radial estabelecido para análise de proximidade das organelas com mitocôndrias. Observe que o quadrante estabelecido é colocado no centro do eixo mitocondrial e a análise de proximidade é feita ao analisar as organelas localizadas dentro dos limites do círculo pré-determinado.

4.5.5.1 Interações com RER, Golgi e Outras Mitocôndrias

Foi analisada a ocorrência de RER, Golgi e mitocôndrias na área de proximidade de cada mitocôndria. Então, foi estabelecida a proporção média de mitocôndrias em interação com estas organelas, para cada grupo de eosinófilos estudados (imaturo, maduro, SHE-pele e sangue).

4.5.5.2 Interações de Mitocôndrias com Corpúsculos Lipídicos

Em eosinófilos maduros do sangue periférico de pacientes saudáveis e do sangue e pele de paciente com SHE, inicialmente foram quantificados o número de CLs por secção celular. Em seguida foi computada a ocorrência de CLs na zona de interação de cada mitocôndria. Então, foi estabelecida a proporção média de mitocôndrias em interação com CLs. A proporção média de CLs que faziam contato direto com mitocôndrias também foi estabelecida para cada grupo de eosinófilos.

4.5.5.3 Interação de Mitocôndrias com Grânulos Específicos

4.5.5.3.1 Interação com Grânulos Específicos Imaturos

Em eosinófilos imaturos foi analisada a ocorrência de grânulos imaturos iniciais e tardios na zona de interação de cada mitocôndria. Assim, foi estabelecida a proporção média de mitocôndrias em interação com grânulos imaturos: (i) independente do estágio de maturação do grânulo ou (ii) levando em conta se os grânulos eram imaturos iniciais ou tardios. A proporção média de grânulos imaturos (iniciais e tardios) que faziam contato direto com mitocôndrias também foi estabelecida para cada grupo analisado.

4.5.5.3.2 Interação com Grânulos Específicos Maduros

Em eosinófilos maduros do sangue periférico de pacientes saudáveis e do sangue e pele de paciente com SHE, foi analisada a ocorrência de grânulos intactos e mobilizados na zona de interação de cada mitocôndria. Assim, foi estabelecida a proporção média de mitocôndrias em interação com grânulos: (i) independente do estágio de ativação do grânulo ou (ii) levando em conta se os grânulos se apresentavam intactos ou mobilizados. Também foi estabelecida a proporção média de grânulos (intactos e mobilizados) que faziam contato direto com mitocôndrias.

Da mesma forma, para cada grupo de eosinófilos analisados, a proporção média de mitocôndrias em interação de proximidade ou contato com EoSVs foi estabelecida para cada grupo estudado.

4.5.5.4 Interações Determinantes e Discriminantes de Eosinófilos na SHE

4.5.5.4.1 Análise de Componentes Principais

Uma análise de componentes principais foi realizada a partir dos dados quantitativos de proximidade, utilizando o software SPSS 20.0, com o objetivo de identificar as características determinantes de eosinófilos nos contextos de SHE. Basicamente, a análise de componentes principais, popularmente denominada de PCA, é uma técnica da estatística multivariada cujo objetivo principal é transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis lineares de mesma dimensão, os denominados componentes principais. Deste modo, os componentes principais apresentam propriedades importantes: cada componente é uma combinação linear de todas as variáveis originais e não são correlacionados entre si. Em geral, os componentes principais são estimados com a finalidade de reduzir o número de variáveis a serem avaliadas e de se obter uma interpretação das combinações lineares construídas, com a menor perda possível da informação, em relação à variação total contida nos dados (MINGOTI, 2007).

4.5.5.4.2 Modelo de Regressão Logística

A regressão logística é um modelo estatístico utilizado para avaliar a relação entre um conjunto de variáveis explicativas (categóricas ou quantitativas) e uma variável resposta dicotômica (ou binária). A estatística resultante é chamada de razão de chances (oddsratio). O modelo logístico, ou regressão logística, é um caso

particular dos modelos lineares generalizados (MLG) com variável resposta binária. O que caracteriza tal modelo como pertencente aos MLG é a presença de uma função de ligação pertencente à família exponencial, a função logito, que é muito utilizada em dados deste tipo (DOBSON; BARNETT, 2018). Na regressão logística, os parâmetros são estimados por meio do método da máxima verossimilhança em um processo iterativo. A exponencial dos coeficientes estimados (oddsratio) representa o aumento na chance de sucesso a cada unidade de aumento na variável explicativa, no caso de variáveis contínuas. Neste estudo, utilizou-se como resposta a variável dicotômica que assumiu o valor “1” quando se tratava de SHE-Pele ou SHE-Sangue, e “0” caso contrário (ou seja, maduro). As variáveis explicativas foram o número de organelas próximas (membrana plasmática, corpúsculos lipídicos, mitocôndrias, grânulos intactos, grânulos mobilizados, núcleo, retículo endoplasmático e vesículas sombrero de eosinófilos) a cada 100 mitocôndrias. Os softwares utilizados foram: Excel 2020, para manipulação e tabulação dos dados, e SPSS 20.0 para a regressão logística.

4.5.6 Processos e Alterações Mitocondriais em Eosinófilos

Foram analisadas qualitativamente a ocorrência de vesículas mitocondriais sendo formadas a partir da membrana externa em eosinófilos imaturos, maduros, e na SHE. Algumas alterações mitocondriais típicas como compartimentalização e presença de corpos elétron-densos também foram investigadas.

4.6 Análises Quantitativas Ultraestruturais

Para estudos de quantificação por MET convencional (quantificação e medições mitocondriais), micrografias eletrônicas de seções de células foram retiradas aleatoriamente de eosinófilos em diferentes condições (eosinófilos imaturos e maduros; eosinófilos envolvidos em patologias). Micrografias eletrônicas foram capturadas por um operador cego para a identificação das mitocôndrias. O total de 300 micrografias eletrônicas foi analisado. Para obter detalhes sobre cada grupo estudado, verifique a Tabela 1. As avaliações foram realizadas em cortes celulares que apresentavam todo o perfil celular e o núcleo. Primeiro uma análise qualitativa, incluindo tamanho, forma e aspecto das cristas, foi feita para caracterizar a morfologia mitocondrial ultraestrutural de eosinófilos. Dadas as diferenças observacionais entre os grupos, uma série de análises quantitativas foram realizadas e tomadas em

conjunto para fornecer algumas informações sobre a diversidade e dinâmica mitocondrial, conforme descrito anteriormente (JUGÉ, 2016).

Os parâmetros celulares avaliados foram: i) número mitocondrial; ii) área mitocondrial; iii) proporção mitocôndria / célula (área da mitocôndria / área do citoplasma, excluindo o núcleo); iv) descritores de forma mitocondrial. O número mitocondrial e a área mitocondrial em proporção à área celular está diretamente associada com a distribuição dessa organela no citoplasma bem como ao seu nível de atividade. O último parâmetro (descritores de forma) consiste na utilização de padrões mensuráveis usados para estruturas circunferenciais, como circularidade ($4\pi \times [\text{área}] / [\text{perímetro}]^2$), circularidade ($4 \times \text{área} / [\pi \times \text{eixo principal}]^2$), proporção (eixo principal / eixo menor) e solidez (área / convexa área). Esta é uma forma quantitativa de analisar a morfologia mitocondrial. Todas as análises quantitativas foram realizadas usando o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

Em seguida foi avaliada a arquitetura das cristas mitocondriais bem como o número médio de cristas que cada grupo analisado apresenta. As cristas foram divididas em três morfologias: *lamelar*, estruturas lineares paralelas que lembram a forma de “prateleiras”, ou *tubularum* padrão na qual as cristas constituem pequenos círculos dispostos na matriz e *sem padrão*, na qual não se pode precisar qual padrão de crista as mitocôndrias apresentam; e o número de cristas foi classificado em dois intervalos: entre 1-4 cristas, considerado um número baixo de cristas e acima de 5 cristas, considerado um número alto de cristas. Na sequência, foi realizada a análise da proximidade das mitocôndrias com outras organelas celulares, na qual foi estabelecida uma circunferência com raio medindo o dobro do valor médio de diâmetro mitocondrial de cada grupo, esse valor nos dá a área de influência de cada mitocôndria. Essa circunferência foi posicionada no centro da mitocôndria e todas as organelas que estavam inseridas no limite da circunferência foram consideradas próximas e/ou em contato.

4.7 Análise Estatística

As estatísticas estão expressas como média \pm SEM (erro padrão da média). As diferenças entre os grupos foram avaliadas usando one-way ANOVA, com nível de significância estatística de $P > 0,05$, seguida pelo teste de comparação múltipla de

Tukey com alfa de 0,05 ou 95% de intervalo de confiança utilizando o software GraphPadPrism 8.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Eosinófilos Imaturos e Maduros

5.1.1 Morfologia e Distribuição Citoplasmática de Organelas nos Eosinófilos

Eosinófilos isolados do sangue periférico de pacientes saudáveis foram tomados como modelo para estudo de eosinófilos maduros. Análises ultraestruturais mostraram que estas células apresentaram núcleo lobulado e presença de grânulos com cristaloide em diferentes proporções, características típicas de eosinófilos maduros. Em contrapartida, para o estudo de eosinófilos imaturos foram analisadas células comprometidas com a linhagem eosinofílica obtidas pela cultura de células do cordão umbilical. Por MET essas células apresentaram núcleo grande monolobulado e grânulos imaturos sem a presença de cristaloide.

Inicialmente, foi observado que ocorre um aumento significativo ($p < 0,05$) de 7% na área proporcional ocupada pelo núcleo na célula madura ($30 \pm 2,2\%$) em relação à célula imatura ($23,1 \pm 1,7\%$) (Figs. 12A,B). Este aumento possivelmente está relacionado com a diminuição da área celular total que ocorre entre eosinófilos imaturos e maduros (imaturo $62 \pm 2,8 \mu\text{m}^2$ e maduro $37 \pm 1,9 \mu\text{m}^2$; média \pm EP, Figuras 12A e B; $p > 0,05$). Além disso, foram evidentes diferenças na morfologia do núcleo entre células imaturas e maduras. Eosinófilos imaturos apresentaram núcleo monolobulado arredondado e homogeneamente eucromático, enquanto núcleos de eosinófilos maduros foram observados segmentados e com cromatina periférica condensada (Figuras 12A e 12B).

Notoriamente, apesar de não haver diferenças significativas da área proporcional ocupada por grânulos entre eosinófilos imaturos e maduros, estes apresentaram aspectos morfológicos distintos nestas células. Em células imaturas foram observadas duas morfologias distintas de grânulos imaturos sem cristaloide, que correspondem a diferentes estágios evolutivos da maturação destes grânulos específicos: (i) grânulos imaturos iniciais (GII), que apresentaram um aspecto irregular, elétron-lúcido com os grânulos apresentando vesículas e no início do processo de preenchimento do processo secretor, que correspondiam a 57,1% do total de grânulos

em eosinófilos imaturos (Figs. 12C.Ci) e (ii) grânulos imaturos tardios (GIT) exibindo uma morfologia circular, elétron-densos já com preenchimento.

total do conteúdo secretório e representavam 42,9% do total de grânulos de eosinófilos imaturos (Figura 12 C e Cii).

Por outro lado, eosinófilos maduros apresentaram: (i) grânulos maduros intactos (GMI) com a presença de cristalóide íntegro e elétron-densos (Figura 12 D e Di) ou (ii) grânulos maduros mobilizados (GMM) que exibiam algum grau de desestruturação do cristalóide, em alguns casos com perda da elétron densidade dos grânulos (Figura 12 D e Dii). Os eosinófilos maduros analisados apresentaram 19,9% e 80,1% de GMI e GMM, respectivamente.

Adicionalmente, eosinófilos imaturos mostraram sistema secretor (RER e complexo de Golgi) mais desenvolvidos quando comparados às células maduras (Figuras 12A e B). Diferenças significativas na quantidade, distribuição e morfologia das mitocôndrias foram observadas entre eosinófilos imaturos e maduros, e serão apresentadas em maiores detalhes a seguir.

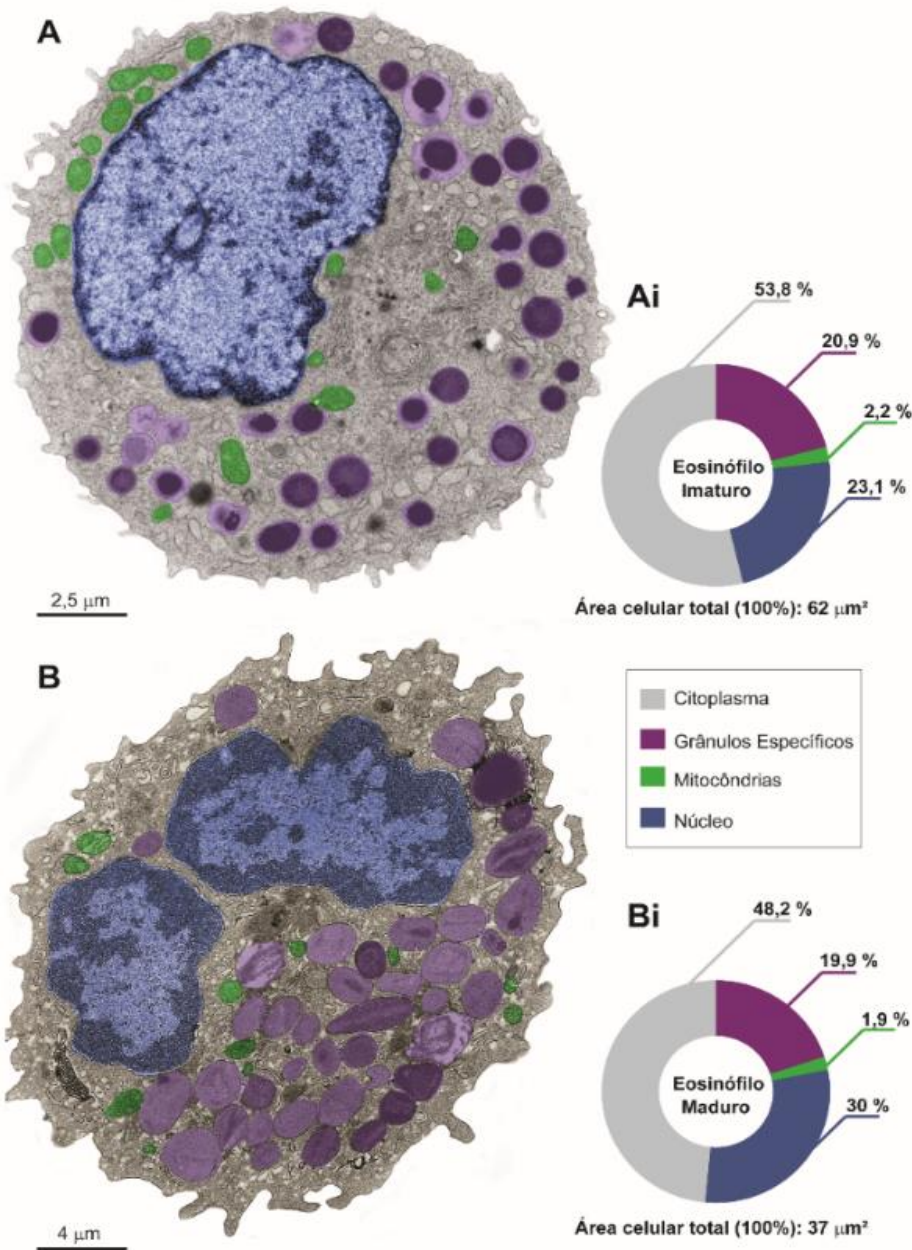
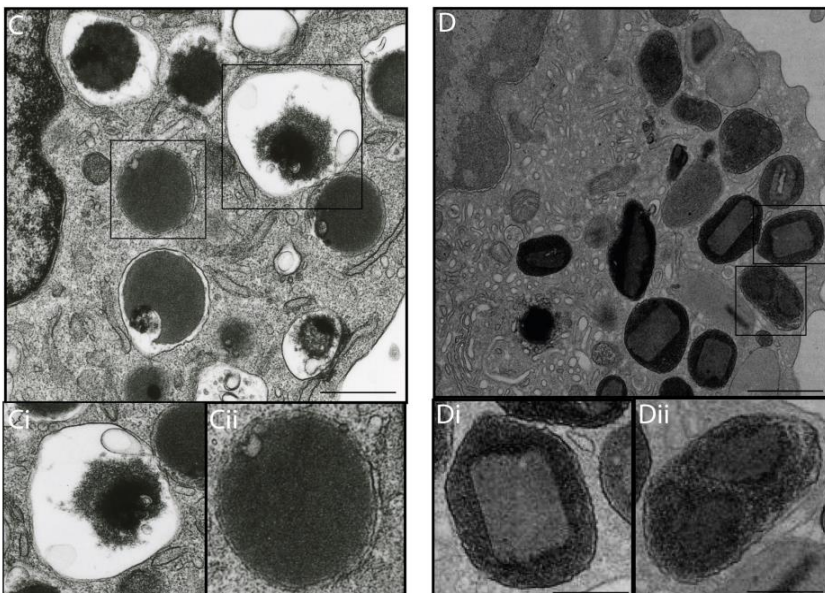


Figura 12- Distribuição citoplasmática de organelas de eosinófilos maduros e imaturos. (A) Eosinófilo imaturo e (B) eosinófilo maduro com suas principais organelas distribuídas pelo citoplasma. Observe o núcleo (em azul), os grânulos específicos (em roxo) e as mitocôndrias (em verde). (Ai e Bi) porcentagem de distribuição de cada organelo para a células imatura e madura. Morfologia de grânulos de eosinófilos imaturos e maduros: (C) Eosinófilo imaturo. (Ci) Grânulo imaturo inicial. (Cii) Grânulo imaturo tardio. (D) Eosinófilo maduro (Di) Grânulo maduro intacto (Dii) Grânulo maduro mobilizado. Barra (C) 800nm, (Ci,Cii) 600nm (D) 600nm (Di,Dii) 450nm



5.1.2 Eosinófilos Imaturos e Maduros Diferem na Quantidade de Mitocôndrias

Análises ultraestruturais quantitativas mostraram que ocorre redução de mitocôndrias distribuídas no citoplasma de eosinófilos imaturos para maduros (Figs.13A,B). Em relação à área ocupada por mitocôndrias essa redução foi de 35% (imaturo= $2,7 \pm 0,3\%$; figura 13A; maduro= $2 \pm 0,2\%$; média \pm EP; Figura 13C; $p > 0,03$), enquanto que o número por área citoplasmática reduziu em 50% (imaturo = $8 \pm 1,7\%$; maduro= $4 \pm 2,1\%$; média \pm EP, Fig. 13D; $p > 0,02$).

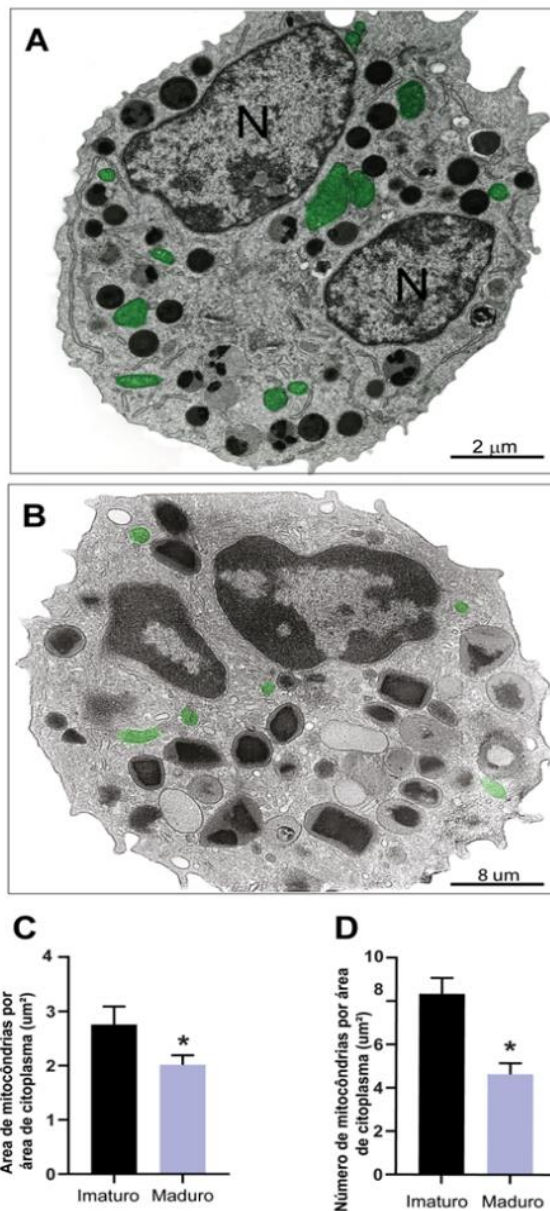


Figura 13- Distribuição mitocondrial em eosinófilos imaturos e maduros. (A) Eosinófilo imaturo e (B) eosinófilo maduro com destaque para as mitocôndrias (marcadas em verde) e o núcleo (N). (C) Figura representando o número médio de mitocôndrias encontrado em cada grupo. (D) Figura representando o número de mitocôndrias por área de citoplasma (μm²). (*) indicam diferenças significativas.

5.1.3 Mitocôndrias Sofrem Alterações de Superfície Durante a Maturação

Visto que a quantidade total de mitocôndrias sofre redução nos eosinófilos maduros em relação aos imaturos, foi feita a avaliação da área individual e forma das mitocôndrias nesses grupos de eosinófilos. Foi observada uma redução significativa da área média das mitocôndrias em eosinófilos maduros (imaturado=215 ± 12,8 nm²; média ± EP; Figs. 14A,Ai; maduro= 99 ± 6,8 nm²; média ± EP, Figs. 14B,Bi,C; p>0,005). Entretanto, foi possível encontrar mitocôndrias de todos os tamanhos em ambos os grupos com a predominância de mitocôndrias com tamanhos menores (1-110 nm², ≈ 60%) em eosinófilos imaturos (Figura 14D)

Em seguida, foi observado que ocorreu uma redução na circularidade das mitocôndrias durante a maturação, já que esta foi maior nos eosinófilos imaturos (imaturado=0,836 ±0,09 unidade amétrica; média ± EP, Figs. 14Ai,E; p>0,01) se comparados aos maduros (maduro=0,861 ±0,07 u.a.; média ± EP, Figs. 14Bi,E; p>0,01). No entanto, ao se observar a análise da distribuição da porcentagem média de mitocôndrias por intervalos de valores de circularidade (Figura 14F), é possível observar que há mitocôndrias com diferentes medidas, embora a distribuição da proporção de mitocôndrias contidas em cada um dos intervalos seja distinta em ambos os grupos. Desta forma fica evidente que há uma alteração em termos de tamanho e forma das mitocôndrias de eosinófilos maduros se comparados aos imaturos, o que indica uma possível alteração no metabolismo energético dessas células durante a maturação.

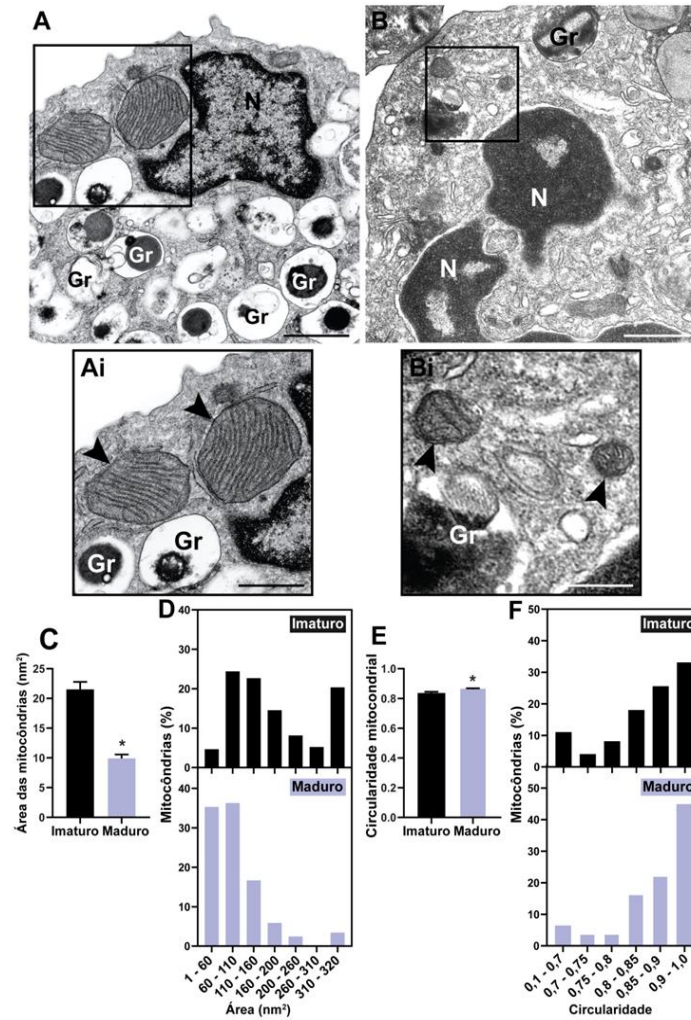


Figura 14- Área média e circularidade de mitocôndrias de eosinófilos imaturos e maduros: (A) Eosinófilo imaturos. (Ai) Em detalhe mitocôndrias de eosinófilos imaturos (cabeças de seta). (B) eosinófilos maduros. (Bi) Em detalhe mitocôndrias de eosinófilos maduros (cabeças de seta). (C) Área média de mitocôndrias em ambos os grupos. (D) Figura de intervalos da proporção das mitocôndrias em intervalos pré-determinados de valores de área. (E) Circularidade média das mitocôndrias de eosinófilos imaturos e maduros. (F) Figura de intervalos da proporção de mitocôndrias em cada faixa pré-determinada de circularidade (*) indicam diferenças significativas. Barras: (A) 700nm, (Ai) 400nm, (B) 800nm, (Bi) 200nm

5.1.4 Eosinófilos têm Diminuição do Número de Cristas Durante a Maturação

As mitocôndrias de eosinófilos imaturos e maduros foram inicialmente analisadas de acordo com seu padrão morfológico de cristas. Mitocôndrias com cristas lamelares (Figura 15 A) ou tubulares (Figs.15B,Bi) foram observadas por MET em ambos os grupos de eosinófilos. Entretanto, análises quantitativas revelaram que houve maior ocorrência de mitocôndrias lamelares (imaturo = $98,8 \pm 5,1$ %; maduro = $92,9 \pm 2,9$ %; media \pm EP, Fig. 15C; $p > 0,0001$) que mitocôndrias tubulares (imaturo = $1,2 \pm 0,9$ %; maduro = $7,1 \pm 0,8$ %, media \pm EP; $p > 0,0001$; Fig. 15D). Além disso, eosinófilos maduros apresentaram uma redução ($\approx 6\%$) na proporção de mitocôndrias lamelares ($p > 0,0001$; Figs.15D,E).

Posteriormente, as cristas mitocôndrias foram quantificadas nas mitocôndrias de eosinófilos imaturos e maduros. Análises quantitativas mostraram que há uma maior proporção de mitocôndrias com alto número de cristas em eosinófilos imaturos ($72 \pm 7,2\%$) se comparados aos maduros ($15,6 \pm 3,7\%$; $p > 0,03$; Figura 15D). Nossos dados de padrão e número de cristas, em conjunto, sugerem que durante a maturação dos eosinófilos pode ocorrer um sucinto processo de remodelamento das cristas mitocondriais.

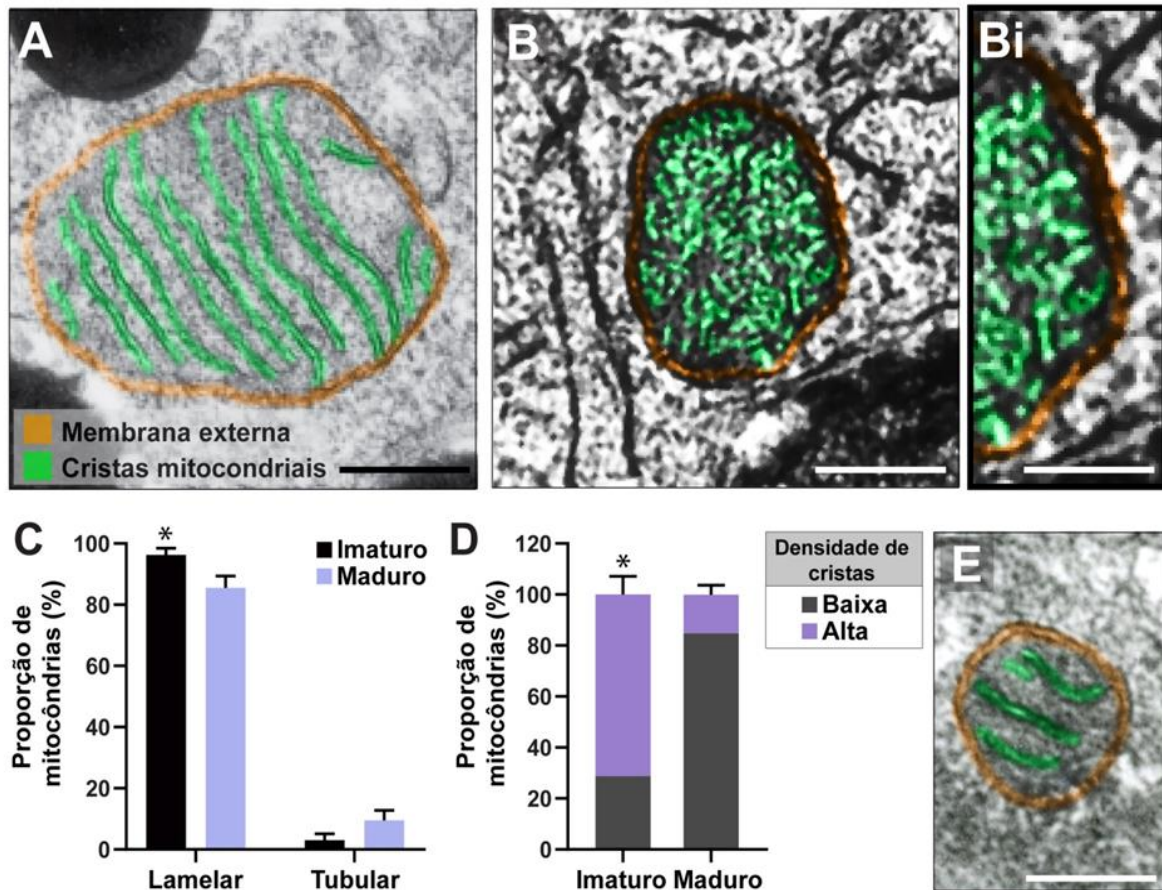


Figura 15- Padrão e número de cristas mitocondriais em eosinófilos imaturos e maduros: (A) Mitocôndria com alto número de cristas com padrão lamelar (marcadas em verde). (B) Mitocôndria com alto número de cristas com padrão tubular (marcadas em verde). (Bi) Em detalhe as cristas dispostas em túbulos. (C) Figura representando a proporção de mitocôndrias que apresentam cristas lamelares e tubulares no grupos imaturo e maduro, respectivamente. (D) Proporção de mitocôndrias que apresentam baixo (<5) e alto (≥5) número de cristas em eosinófilos imaturos e maduros, respectivamente. (E) Mitocôndrias de eosinófilos maduros com baixo número de cristas de padrão.

5.1.5 Ocorre Interação com Diferentes Organelas na Maturação de Eosinófilos

Um aspecto interessante observado no presente trabalho foi a interação das mitocôndrias dos eosinófilos (maduros e imaturos) com diferentes organelas, como RER (Figura 16 A), complexo de Golgi (Figura 16 B), outras mitocôndrias (Figura 16 C) e grânulos específicos (Figura 16 D). Desta forma, interações de proximidade e/ou contato que mitocôndrias estabeleciam com outras organelas foram analisadas individualmente e baseadas no estabelecimento de uma zona radial de proximidade, conforme descrito no Material e Métodos (Seção 4.5.4).

Análises ultraestruturais quantitativas demonstraram uma redução significativa na interação de mitocôndrias com RER em eosinófilos maduros, em comparação com células imaturas (imaturo = $78,5 \pm 4,7\%$; maduro = $62,3 \pm 4,5\%$, $p > 0,08$, Figura 16 Ai). Interações de mitocôndrias com o complexo de Golgi e entre mitocôndrias não foram significativamente diferentes entre eosinófilos imaturos e maduros (Figuras 16Bi e Ci). No entanto, a interação das mitocôndrias com grânulos específicos de eosinófilos chamou a atenção pelo fato de que quase a totalidade das mitocôndrias tinha proximidade com grânulos. Assim, outros aspectos mais detalhados dessa interação são apresentados nos tópicos a seguir.

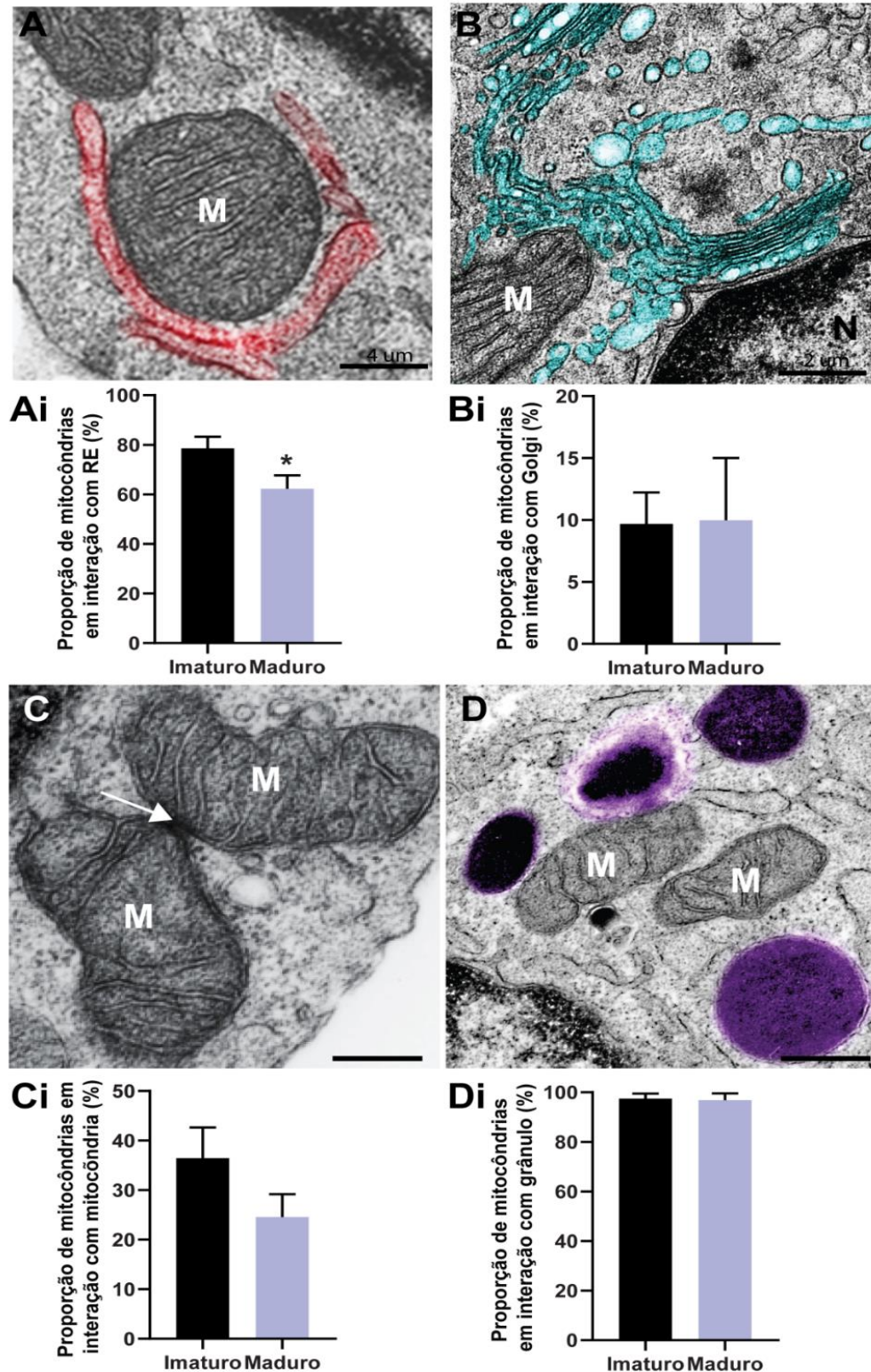


Figura 16- Interação de mitocôndrias com outras organelas em eosinófilos imaturos e maduros: (A) Mitocôndrias em interação com RE (em vermelho); (Ai) Figura mostrando a proporção de mitocôndrias interagindo com RE em eosinófilos imaturos e maduros, respectivamente. (B) Mitocôndrias em interação com Golgi (em azul); (Bi) Figura mostrando a proporção de mitocôndrias interagindo com Golgi em eosinófilos imaturos e maduros, respectivamente. (C) Mitocôndrias em interação com outras mitocôndrias (seta branca); (Ci) Figura mostrando a proporção de mitocôndrias interagindo com outras mitocôndrias em eosinófilos imaturos e maduros, respectivamente. (D) Mitocôndrias em interação com grânulos específicos (em roxo); (Di) Figura mostrando a proporção de mitocôndrias interagindo com grânulos específicos em eosinófilos imaturos e maduros, respectivamente. (*) indicam diferenças significativas. Barras: (A) 500nm, (B) 500nm, (C) 250nm (D)300nm

5.1.6 Mitocôndrias Interagem com Grânulos em Formação na Maturação

Para a análise da interação de mitocôndrias com grânulos, foi considerada a classificação de grânulos imaturos na fase inicial (Fig.17A) e tardia (Fig. 17B), conforme visto anteriormente (Secção 5.1.1).

A porcentagem de mitocôndrias que apresentavam proximidade com cada tipo de grânulo foi quantificada, e observou-se que a maior parte das mitocôndrias estavam próximas a grânulos imaturos em estágio inicial (GII=66,5 ± 6,5 %; Fig.17A; GIT=40,1 ± 6,5 %; fig. 15B,C;media ± EP;p>0,003), considerando-se o fato de que uma mesma mitocôndria poder estar próxima de mais de um tipo de grânulos simultaneamente, o que indica um envolvimento das mitocôndrias na maturação de grânulos em estágios iniciais da granulogênese nos eosinófilos.

5.1.7 Em Eosinófilos Imaturos 45% dos Grânulos Interagem com Mitocôndrias

Após observar alguns aspectos relevantes a respeito da relação entre grânulos e mitocôndrias, mais análises a respeito dessa interação foram feitas. Ao avaliar a proximidade de grânulos com mitocôndrias, foi discriminado qual destes estabeleciam contato com elas, levando-se em consideração a forma pela qual foram classificados.

Surpreendentemente, notou-se que ambos os tipos de grânulos estabeleciam contato com mitocôndrias na mesma proporção (GII=44,87 ± 6,1%, Fig. 17D; GIT= 43,53 ± 5,8%, fig. 17E; média ± EP; p>0,003), em alguns casos, ocorreu a projeção de parte da membrana mitocondrial para o interior do grânulo (Fig. 17F), o que suporta a ideia de que os grânulos dependem do aporte mitocondrial para se desenvolverem durante a granulogênese independente do estágio da maturação em que se encontram.

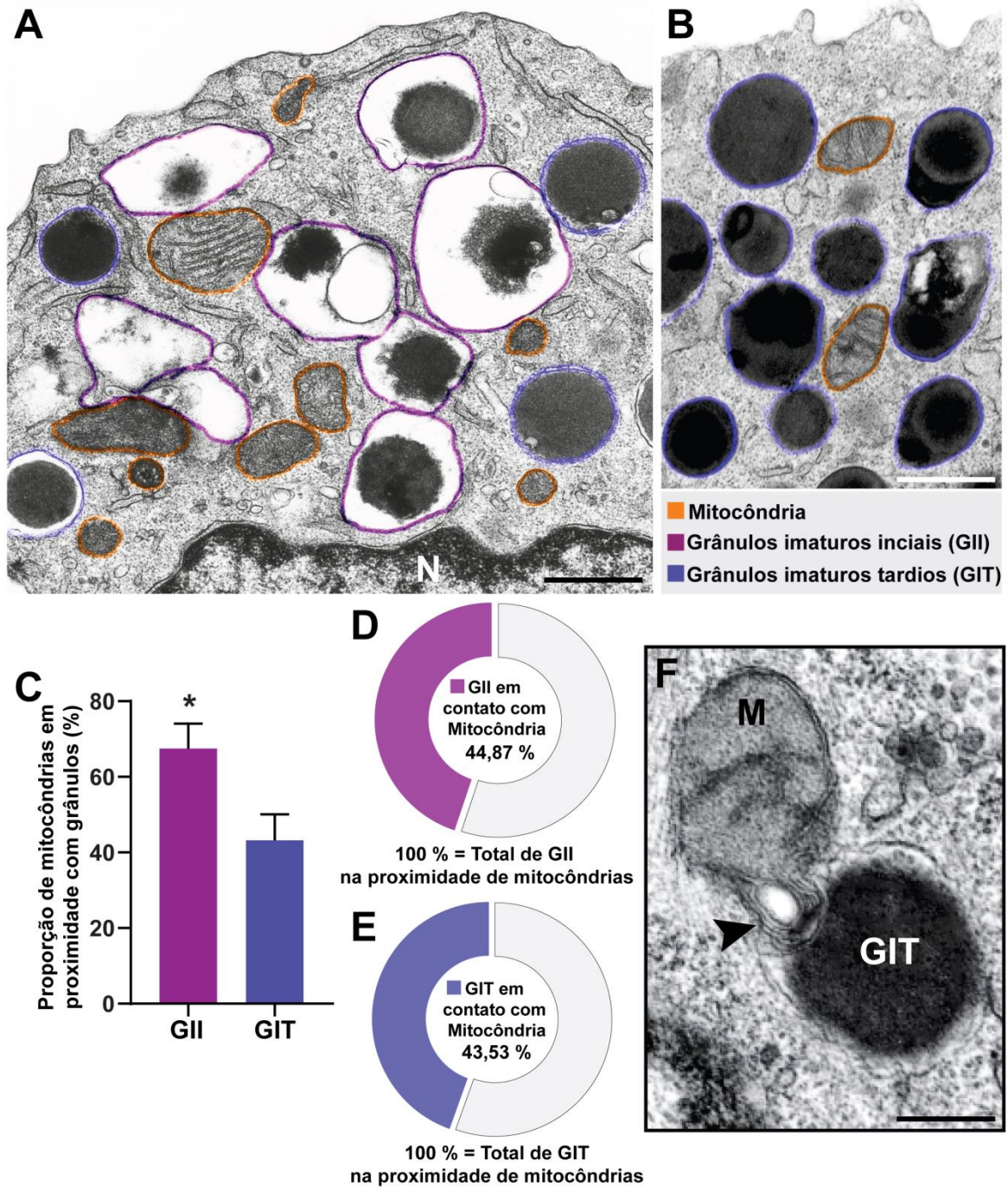


Figura 17- Interação de mitocôndrias com grânulos específicos imaturos: (A) Interação de mitocôndrias (em laranja) com grânulos imaturos iniciais (em roxo). (B) Interação de mitocôndrias (em laranja) com grânulos imaturos tardios (em azul). (C) Proporção de mitocôndrias em proximidade com grânulos. (D) Proporção de grânulos imaturos iniciais em contato com mitocôndrias. (E) Proporção de grânulos imaturos tardios em contato com mitocôndrias. (F) Mitocôndria em contato com grânulos, observa-se a projeção da membrana mitocondrial para o interior do grânulo (cabeças de seta) (*) indicam diferenças significativas. GII (grânulos imaturos iniciais). GIT (grânulos imaturos tardios). Barras: (A) 400nm, (B) 450nm, (F) 500nm

5.1.8 Mitocôndrias Interagem com Grânulos Mobilizados na Célula Madura

Na análise de eosinófilos maduros foi vista estrita relação de grânulos e mitocôndrias (Figs. 18A,B), em alguns casos essas organelas estabeleciam contato (Figs. 18Bi,Bii).

A partir dessa observação, foi avaliado se mitocôndrias estabeleciam uma proximidade diferencial com os dois tipos de grânulos presentes em eosinófilos maduros: intactos (Fig.18A e 17B) e mobilizados (Figura 18C), seguindo a classificação estabelecida anteriormente (Secção 5.1.1). As análises levaram em consideração a possibilidade de uma mesma mitocôndria interagir com mais de um tipo de grânulo simultaneamente.

Os resultados apontam mitocôndrias interagindo preferencialmente com grânulos mobilizados (intacto= $38,4 \pm 7,7\%$; mobilizado= $93,7 \pm 2,2\%$; fig. 18A B,D; media \pm EP; $p > 0,001$), apontando para uma participação das mitocôndrias no processo de mobilização e conseqüente liberação de conteúdo desses grânulos.

5.1.9 Nos Eosinófilos Maduros 14% dos Grânulos Interagem com Mitocôndrias

Após observar alguns aspectos relevantes a respeito da relação entre grânulos e mitocôndrias, mais análises a respeito dessa interação foram feitas. Ao avaliar a proximidade de grânulos com mitocôndrias, foi discriminado qual destes estabeleciam contato com elas, levando-se em consideração a forma pela qual foram classificados. (Figs.1 G,Gi)

A quantificação da porcentagem de grânulos que estabeleciam contato com as mitocôndrias mostrou que não há interação diferencial de grânulos com mitocondriais de acordo com o tipo de grânulo (intacto= $12,39 \pm 6,4\%$; mobilizado= $14,54 \pm 5,7\%$; Figs. 18A,B,D; media \pm EP, $p > 0,001$), reforçando a ideia de que mitocôndrias tenham relevância para o funcionamento do grânulo de maneira geral, independente do seu estado de ativação.

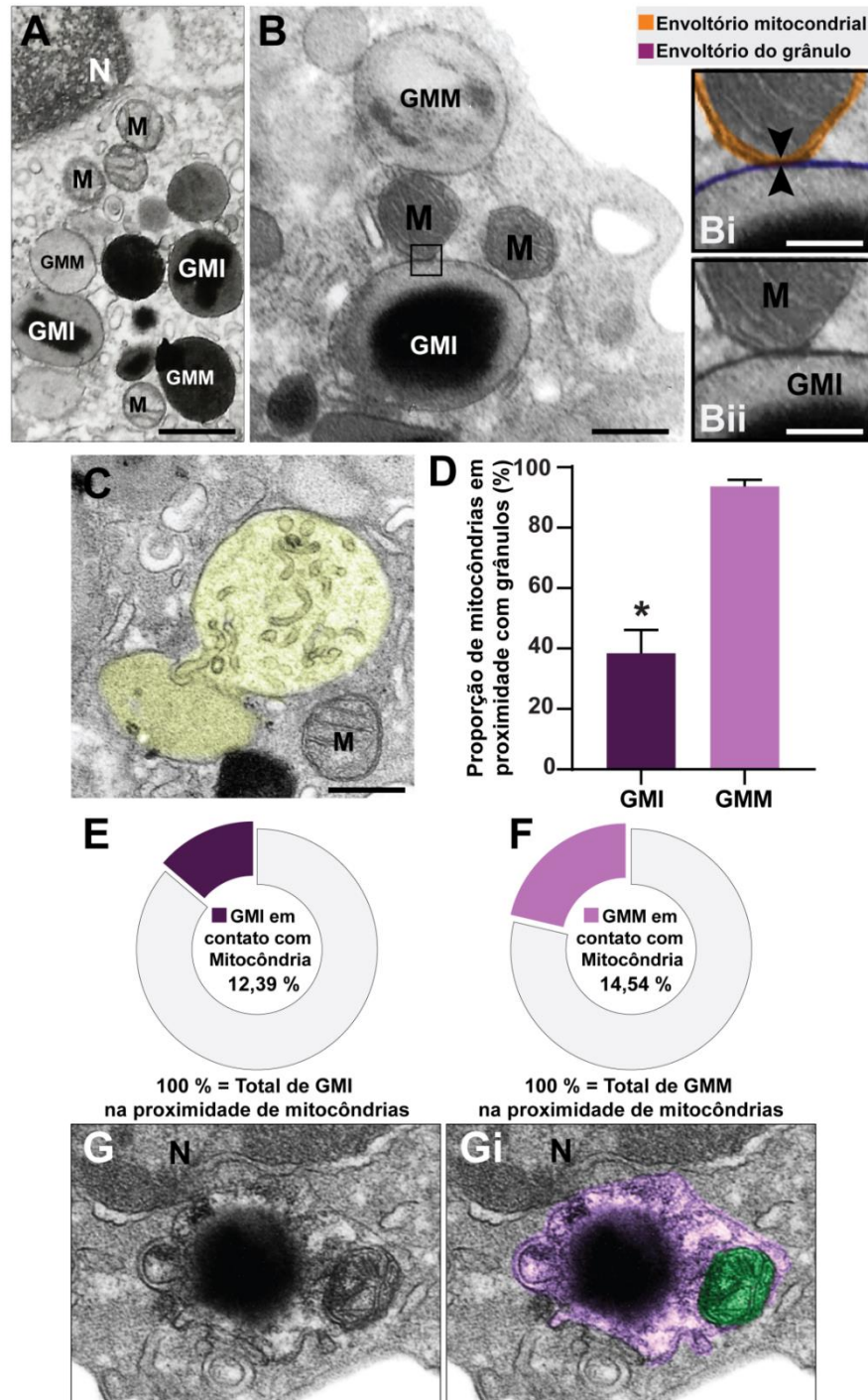


Figura 18- Interação de mitocôndrias com grânulos específicos maduros: (A) Mitocôndrias em proximidade com grânulos. (B) Mitocôndrias interagindo com grânulos maduros intactos e mobilizados (Bi,Bii) No detalhe observa-se o contato entre membranas do grânulo (em azul) e da mitocôndria (emlaranja). (C) Mitocôndrias (M) em proximidade com grânulo mobilizado (em amarelo). (D) Proporção de mitocôndrias em proximidade com grânulos intactos e mobilizados, respectivamente. (E)Proporção de grânulos maduros intactos em contato com mitocôndrias (F)Proporção de grânulos maduros mobilizados em contato com mitocôndrias (G,Gi);mitocôndria (em verde) dentro de um grânulos maduro de eosinófilos (em roxo).(*) indicam diferenças significativas. GMI (grânulos maduros intactos).GMM (grânulos maduros mobilizados). Barra: (A) 350nm, (B) 550nm, (Bi)150nm, (Bii)150nm, (C) 400nm.

5.1.10 Mitocôndrias de Eosinófilos Sofrem Alterações durante a Maturação

Sabe-se que mitocôndrias podem sofrer alterações de acordo com o contexto ao qual a célula está envolvida. Dessa forma, foram avaliadas quais possíveis alterações as mitocôndrias sofrem durante o processo de maturação.

Foram avaliadas cinco alterações: compartimentalização, formação de corpos eletrondensosvesículação e fusão. Dessa apenas três foram observadas em mitocôndrias de eosinófilos imaturos e maduros: Compartimentalização (Figura 19A), formação de corpos eletrondensos (Figura 19B) e vesículação (Figura 19C).No entanto, a função dessas alterações no contexto da maturação de eosinófilos ainda precisa ser melhor compreendida.

Foi observada uma proporção de 4,7% e 8,6% de formação de corpos eletrondensos; 1,2% e 1,1% de compartimentalização mitocondrial e 11,1% e 6,3% de vesículação do total de mitocôndrias de eosinófilos imaturos e maduros, respectivamente.

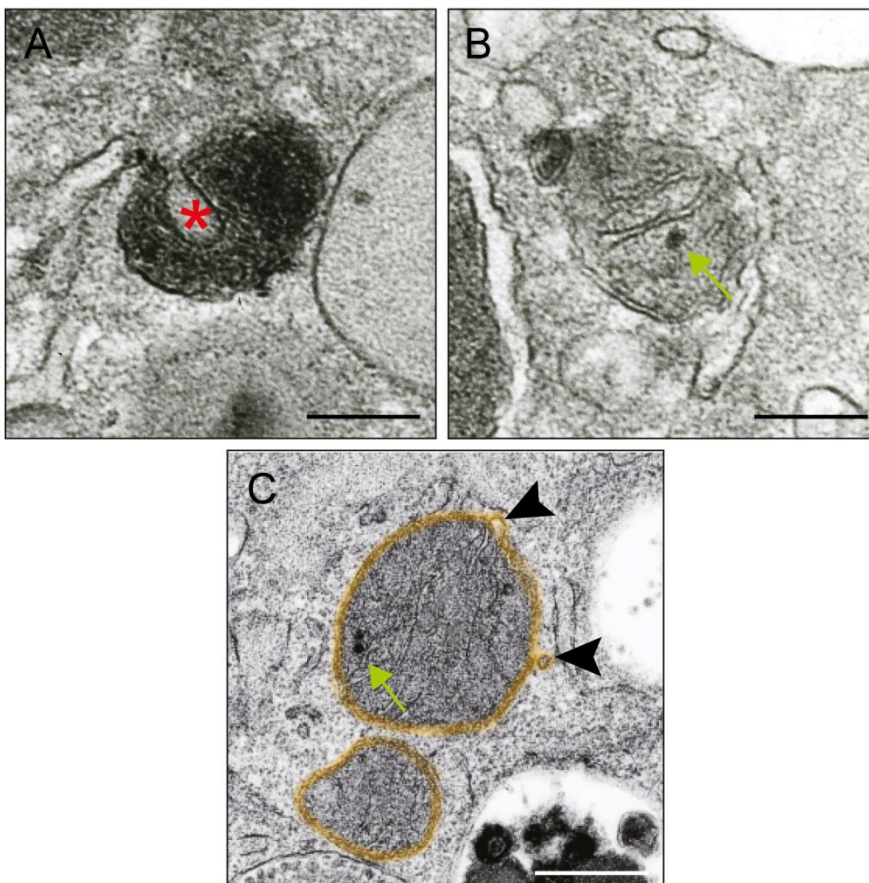


Figura 19- Alterações mitocondriais em eosinófilos imaturos e maduros: (A) Compartimentalização mitocondrial (marcada pelo asterisco em vermelho). (B) Formação de Corpos Eletrondensos (indicado pela seta em verde). (C) Vesículação mitocondrial (indicados pelas cabeças de seta), observa-se ainda a presença de corpos eletrondensos (indicados pela seta verde). Barra: (A) 500nm, (B) 550 nm, (C) 650nm.

5.2 Eosinófilo na Síndrome de Hipereosinofilia

5.2.1 Eosinófilos são Recrutados para o Sangue e a Pele em Quadros de SHE

Eosinófilos isolados sangue periférico e biópsia de pele obtidas de um mesmo paciente que apresentava SHE associada a mutação negativa do fator de crescimento derivado das plaquetas foram utilizados para realização das análises ultraestruturais. Estas células apresentaram bilobulação nuclear, grânulos específicos contendo cristalóide, com uma proporção destes grânulos apresentando aspectos de mobilização, característica marcante de eosinófilos envolvidos em contextos de ativação, como é o caso de patologias(Figs20A,B)

Os grânulos intactos e mobilizados foram quantificados em ambos os grupos e foi observada uma proporção de 15,1% e 14,2% de grânulos intactos e 84,9% e 85,8% de grânulos mobilizados na SHE do sangue e da pele, respectivamente.

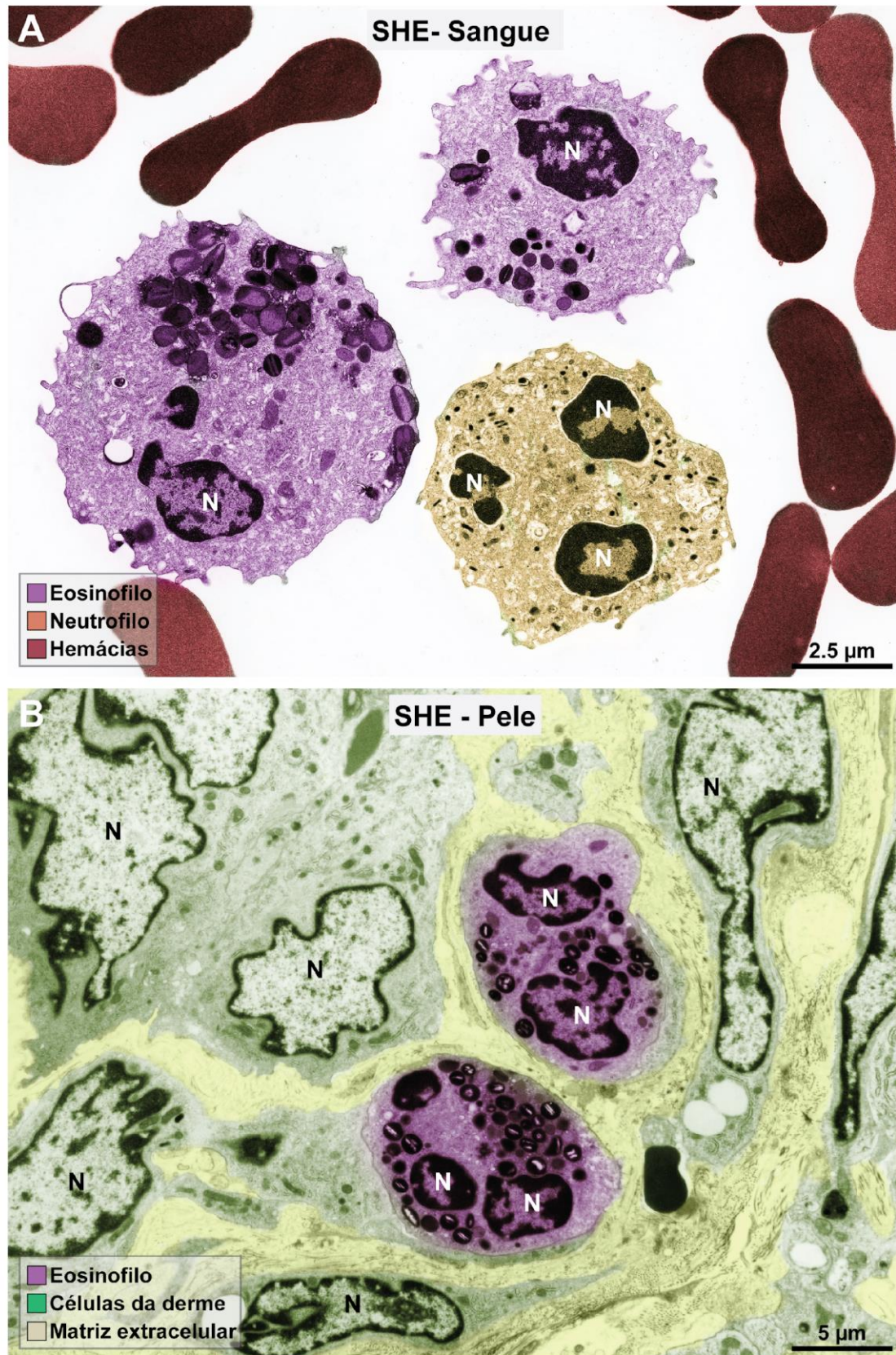


Figura 20- Eosinófilos envolvidos na SHE do sangue e da pele: (A) Eosinófilos envolvidos na SHE do sangue (em roxo), observa-se também a presença de neutrófilo (amarelo) e hemácias (vermelho). (B) Eosinófilos envolvidos na SHE da Pele (em roxo), observa-se também a presença de células da derme (em verde) e matriz extracelular (amarelo). (N) núcleo

5.2.2 Eosinófilos na SHE Sofrem Alterações de Superfície no Sangue e na Pele

Análises ultraestruturais de eosinófilos na SHE foram realizadas para avaliar a quantidade de mitocôndrias presente em cada um dos grupos.

Os dados mostraram que, surpreendentemente, apesar de ocorrer um aumento de quase 50% do número de mitocôndrias na SHE da pele em relação a do sangue (sangue= $4,4 \pm 0,46\%$; pele= $8,5 \pm 0,81\%$, figura 21A, B e C média \pm EP; $p > 0,0001$) a área total de mitocôndrias por área de citoplasma não se altera de forma significativa entre os grupos (sangue= $2,4 \pm 0,18\%$; pele= $2,8 \pm 0,32\%$ Figura 21A, B e D, media \pm EP; $p > 0,08$).

Foram quantificadas ainda, a área média das mitocôndrias, que teve redução em 17% na pele em comparação ao sangue (sangue= $15,2 \pm 1\%$, pele= $9 \pm 3,5\%$ Figs. 21A,B,E, média \pm EP; $p > 0,0001$). Entretanto, foi possível encontrar mitocôndrias de todos os tamanhos em ambos os grupos com a predominância de mitocôndrias com tamanhos menores ($1-110 \text{ nm}^2 \approx 70\%$) em eosinófilos na pele (Figura 21F), o que sugere que mitocôndrias estejam sofrendo alterações e adaptações metabólicas de acordo com o contexto em que o eosinófilo está inserido.

A análise de circularidade, no entanto, não apresentou diferença significativa entre os grupos (sangue= $0,896 \pm 0,03 \text{ u.a}$, pele= $0,825 \pm 0,09 \text{ u.a}$, Figura 21A, B e G; media \pm EP; $p > 0,3$). Para essa análise também foi feita a distribuição mitocondrial em intervalos e foi observado que a proporção de mitocôndrias distribuídas em cada intervalo, não variou entre os grupos (Fig. 21H).

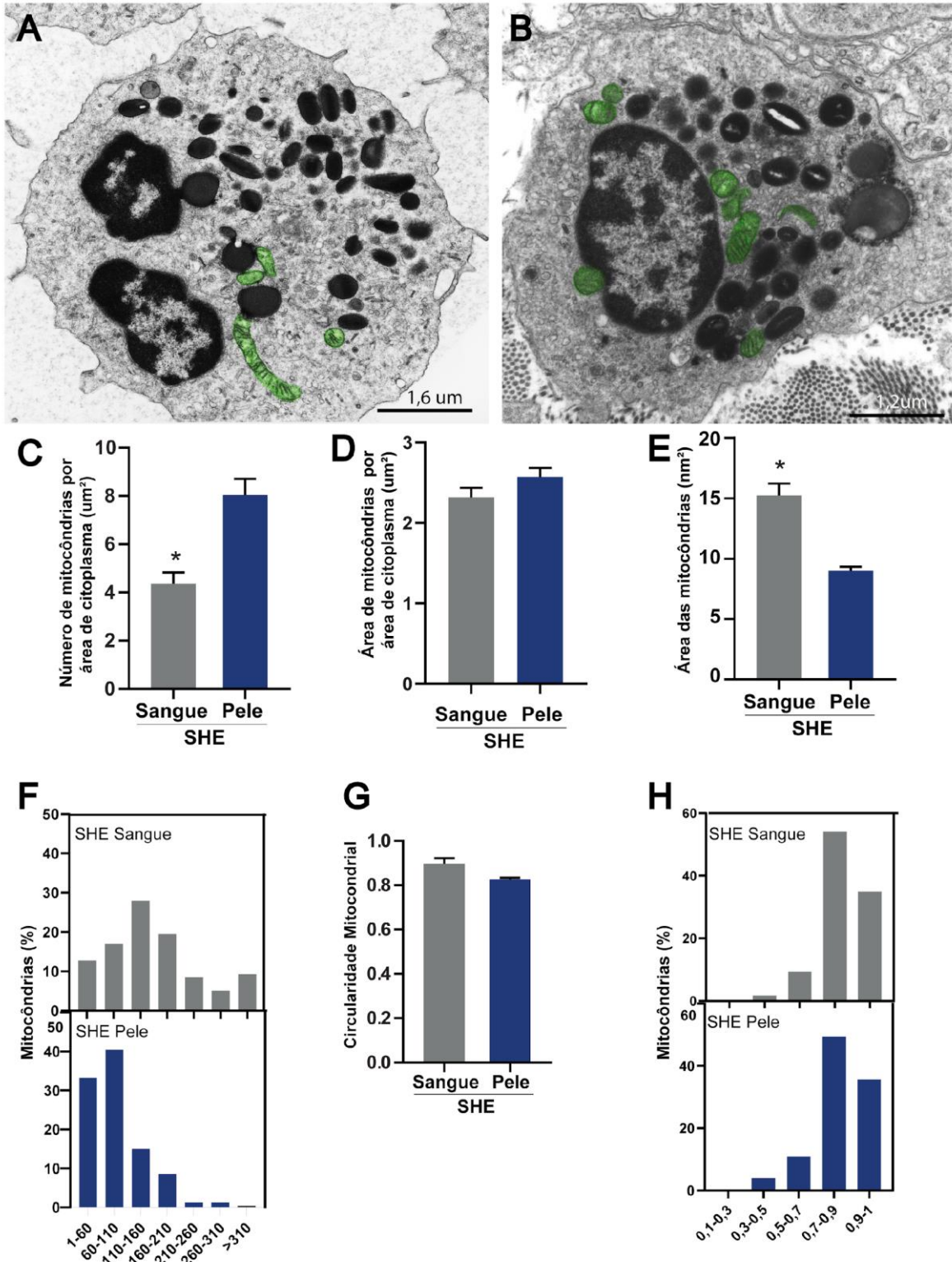


Figura 21: Distribuição, área média e circularidade de mitocôndrias de eosinófilos na SHE: (A) Eosinófilos envolvidos na SHE do sangue (B) Eosinófilos envolvidos na SHE da pele (C) Gráfico do número de mitocôndrias por área de citoplasma (um²) (D) Figura da área de mitocôndria por área de citoplasma (um²) (E) Figura da área média de mitocôndrias (um²) (F) Distribuição de mitocôndrias de acordo com o tamanho individual (G) Figura representando circularidade mitocondrial (H) Distribuição de mitocôndrias de acordo com a circularidade.

5.2.3 Eosinófilos em Contextos de SHE não Alteram o Número de Cristas

As mitocôndrias de eosinófilos na SHE no sangue e na pele foram inicialmente analisadas de acordo com seu padrão morfológico de cristas. Mitocôndrias com cristas lamelares (Figura 22A), tubulares (Figura 22 B, Bi) e sem padrão/misto (Figs. 22C,Ci) foram observadas por MET em ambos os grupos de eosinófilos. Entretanto, análises quantitativas revelaram que houve maior ocorrência de mitocôndrias lamelares (sangue= $44,7 \pm 4,6\%$; pele= $53,4 \pm 3,9$; figura 22A e D; média \pm EP, $p>0,05$), em comparação as tubulares (sangue= $1,9 \pm 1,8\%$; pele= $8 \pm 1,5\%$;Figura 22B,Bi e D; média \pm EP, $p>0,05$). No entanto, interessante há uma alta proporção de mitocôndrias que não apresentaram padrão de cristas definido ou mesmo que apresentavam parte de suas cristas tubular e parte lamelar (sangue= $25,1 \pm 3,6\%$; pele= $18,6 \pm 3,1\%$; Figura 22C, Ci e D; média \pm EP, $p>0,05$).

Em seguida, foi avaliada a variação média da proporção de mitocôndrias lamelares na SHE em comparação ao grupo maduro não estimulado. As quantificações mostraram que em ambos os grupos de SHE ocorre aumento da proporção de mitocôndrias com padrão lamelar em comparação ao maduro. (sangue= $37,1 \pm 1,8$; pele= $63,8 \pm 2,2$;figura 22E;média \pm EP, $p>0,05$).

Na sequência, as cristas mitocôndrias foram quantificadas nas mitocôndrias de eosinófilos na SHE. As análises apontaram para uma equitativa proporção de mitocôndrias com baixo (sangue= $67,9 \pm 7\%$; pele= $80,9 \pm 6,8\%$, figura 22F; média \pm EP, $p>0,05$) e alto (sangue= $32,1 \pm 6,8\%$; pele= $19,1 \pm 8,2\%$, figura 22F; média \pm EP, $p>0,05$) número de cristas em ambos os grupos, com predominância de mitocôndrias que apresentaram baixo número de cristas.

A exemplo do que foi feito para o padrão, aqui também foi avaliada a variação do número de cristas em relação ao grupo maduro. Foi observado um aumento do número médio de cristas em ambos os grupos de SHE em relação ao grupo maduro, com maior significância na pele, no entanto (sangue= $22,4 \pm 2,5\%$; pele= $138,1 \pm 4,5\%$;figura 22F; média \pm EP, $p>0,05$).

Esses resultados corroboram que há adaptação metabólica das mitocôndrias através de remodelamento do padrão de cristas.

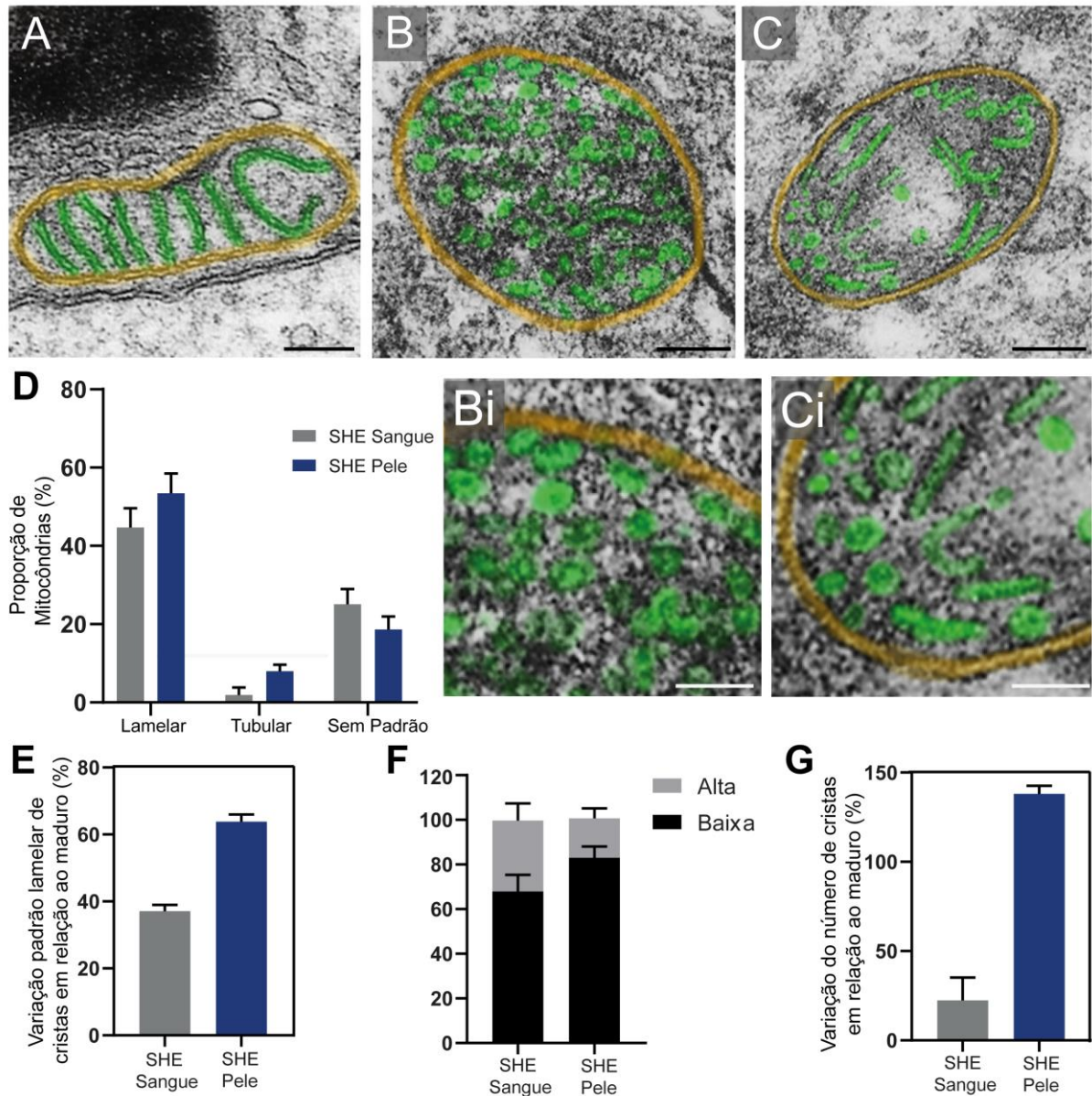


Figura 22: Padrão e número de cristas mitocondriais em eosinófilos envolvidos na SHE:

(A) Mitocôndria com alto número de cristas com padrão lamelar (marcadas em verde). (B) Mitocôndria com alto número de cristas com padrão tubular (marcadas em verde). (Bi) Em detalhe as cristas dispostas em túbulos. (C) Mitocôndria com alto número de cristas com padrão misto (marcadas em verde). (Ci) Em detalhe as cristas dispostas de forma mista. (D) Figura representando a proporção de mitocôndrias que apresentam cristas lamelares, tubulares e mistas nos grupos de SHE (E) Figura representando a variação da proporção de cristas lamelares nos grupos de SHE em relação ao grupo maduro. (F) Proporção de mitocôndrias que apresentam baixo (<5) e alto (≥5) número de cristas em

5.2.4 Mitocôndrias Interação com Diferentes Organelas na SHE

Na SHE da pele e do sangue foram observadas uma alta proporção de mitocôndrias interagindo com diversas organelas. Ao quantificar essas interações, foi observado que as mitocôndrias interagem preferencialmente com RE (sangue= $54,7 \pm 5,3\%$; pele= $45,3 \pm 5\%$, figura 23A e Ai; media \pm EP, $p > 0,1$) outras mitocôndrias (sangue= $26,6 \pm 6\%$; pele= $34,2 \pm 6,1\%$, figura 23B e Bi; media \pm EP; $p > 0,2$) grânulos (sangue= $55,1 \pm 7,1\%$; pele= $73,3 \pm 5,8\%$ figura 23C media \pm EP, $p > 0,2$), corpúsculos lipídicos (sangue= $23,9 \pm 7\%$; pele= $39,6 \pm 6\%$; figura 23D e Di, media \pm EP, $p > 0,4$) e EoSVs (sangue= $65,4 \pm 5,3\%$; pele= $36,4 \pm 5,5$, figura 23E e Ei, media \pm EP; $p > 0,2$) sem diferença significativa entre os grupos.

Em seguida, foi analisada a variação da proporção de interação desses grupos em relação ao grupo maduro. Foram observadas variações em ambos os grupos na análise de todas as organelas. No entanto, a SHE na pele foi o grupo que apresentou maior variação nas análises de RE (sangue= $-8,5 \pm 7,7\%$; pele= $-27,3 \pm 7,9\%$, Figura 23A e Aii, media \pm EP, $p > 0,05$), mitocôndrias (sangue= $12,3 \pm 0,04\%$; pele= $38,8 \pm 0,4\%$, figura 23B e Bii, media \pm EP, $p > 0,0001$) e CL (sangue= $239 \pm 7\%$; pele= $395 \pm 6,1\%$, Figura 23D e Dii, media \pm EP, $p > 0,05$) enquanto a hipereosinofilia do sangue apresentou as maiores variações de grânulo (sangue= $-13,8 \pm 8,7\%$; pele= $5,8 \pm 6,5\%$, Figura 23C e Cii media \pm EP, $p > 0,04$) e EoSVs (sangue= $96 \pm 2,6\%$; pele= $86 \pm 4,3\%$; Figs. 23E, Eii; media \pm EP; $p > 0,0004$).

Em conjunto essas análises suportam a ideia de que mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas e capazes de interagir com uma ampla gama de organelas celulares em eosinófilos envolvidos na SHE. Os resultados sugerem ainda, que o contexto patológico possa contribuir para intensificação dessas interações visto que houve expressivas variações dessas interações nesses grupos quando comparados ao maduro não estimulado.

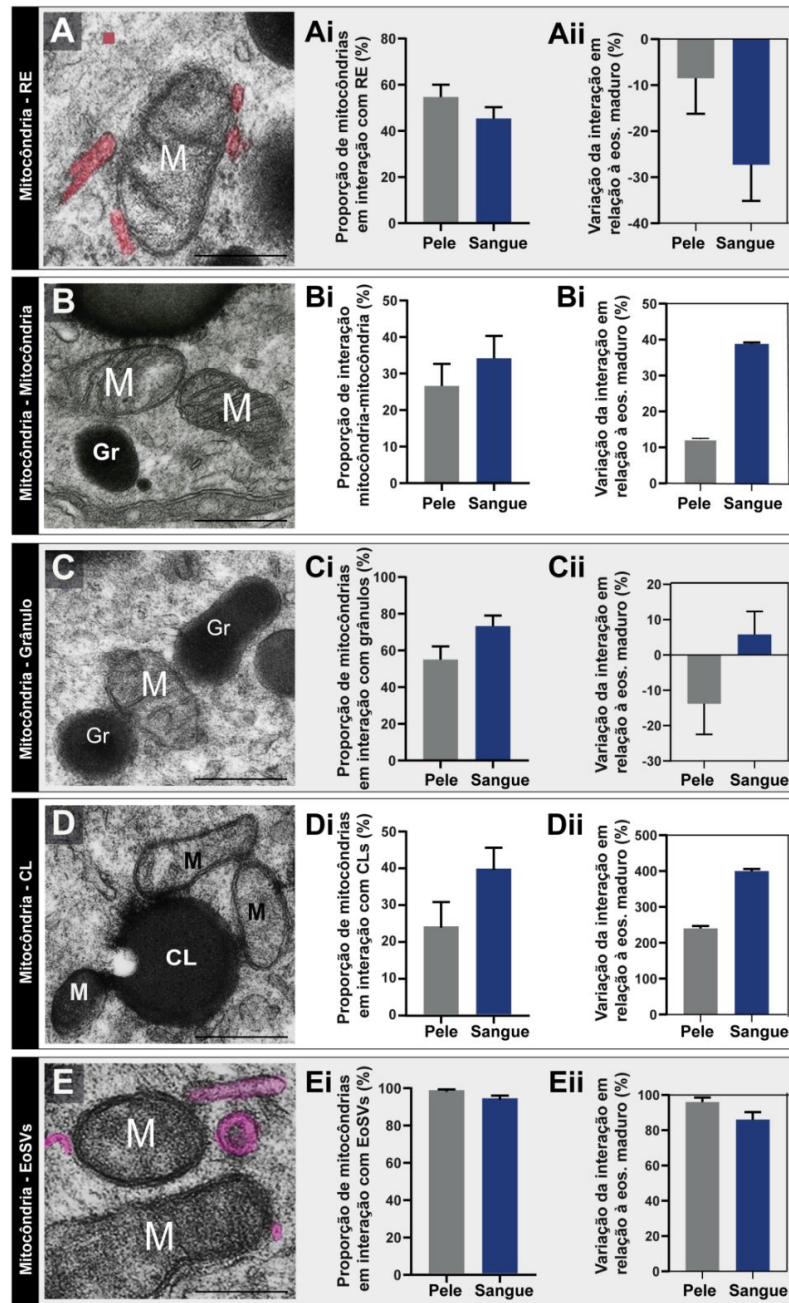


Figura 23- Interação de mitocôndrias com outras organelas em eosinófilos envolvidos na SHE: (A) Mitocôndrias em interação com RE (em vermelho) (Ai) Figura mostrando a proporção de mitocôndrias interagindo com RE em eosinófilos envolvidos na HES respectivamente. (Aii) Figurada variação da proporção de interação mitocôndria-RE nos grupos de SHE em relação ao grupo maduro (B) Mitocôndrias em interação com outras mitocôndrias (Bi) Figura mostrando a proporção de mitocôndrias interagindo com outras mitocôndrias em eosinófilos envolvidos na SHE. (Bii) Figura da variação da proporção de interação mitocôndria-mitocôndria nos grupos de SHE em relação ao grupo maduro (C) Mitocôndrias em interação com grânulos específicos. (Ci) Figura mostrando a proporção de mitocôndrias interagindo com grânulos específicos em eosinófilos envolvidos na SHE. (Cii) Figura da variação da proporção de interação mitocôndria-grânulo em relação ao grupo maduro (D) Mitocôndrias em interação com Corpúsculo Lipídico (Di) Figura mostrando a proporção de mitocôndrias interagindo com CL em eosinófilos envolvidos na SHE. (Dii) Figura da variação da proporção de interação mitocôndria-CL nos relação ao grupo maduro (E) Mitocôndrias em interação com EoSvs. (Ei) Figuramostrando a proporção de mitocôndrias interagindo com EoSvs em eosinófilos envolvidos na SHE. (Eii) Figura da variação da proporção de interação mitocôndria-EoSvs nos grupos de SHE em relação ao grupo maduro. Barra: (A) 800nm, (B) 900nm, (C) 850nm, (D) 600nm, (E) 750nm.

5.2.5 Mitocôndrias têm maior interação com corpúsculos na SHE da pele

Inicialmente, análises qualitativas mostraram que há um número relevante de mitocôndrias e corpúsculos em proximidade nos eosinófilos em SHE (Fig. 24A), em alguns casos é visto que essas organelas estabelecem contato entre suas membranas (Figs. 24B,C).

Para avaliar o quão frequente é essa interação nos grupos, foi feita a quantificação da proporção de mitocôndrias que possuíam corpúsculos lipídicos em sua zona de proximidade de acordo com os critérios adotados para a análise (ver M&M, parte 4.5.4.2).

Foi observado que SHE na pele tem uma interação mitocôndria-CL significativamente maior se comparado ao sangue e ao grupo maduro (maduro= $10,45 \pm 2,8\%$; sangue= $23,9 \pm 7\%$; pele= $39,6 \pm 6,1\%$, Figura 24A e C, média \pm EP, $p > 0,003$).

5.2.6 A Interação de CL com a Mitocôndria Varia entre os Grupos

Após observar alguns aspectos relevantes a respeito da relação entre corpúsculos e mitocôndrias, mais análises a respeito dessa interação foram feitas. Foi visto um aumento de 7% da proporção de contato do corpúsculo e mitocôndria na SHE da pele em relação ao sangue e um aumento de 17,3% em relação ao grupo maduro (maduro= $6,7 \pm 0,13\%$; figura 24D; sangue= $17 \pm 0,24\%$, figura 24E; pele= $24 \pm 0,37\%$, figura 24F; Figuras 24Ai e B, $p > 0,05$).

Além disso, para avaliar a quantidade, em média, de corpúsculos de cada grupo estudado, foi feita a quantificação desses corpúsculos por secção celular. O resultado foi significativamente maior em SHE da pele (maduro= $0,45 \pm 0,1\%$; sangue= $1,6 \pm 0,4\%$; pele= $3,3 \pm 0,6\%$; Figs. 24A,G; média \pm EP; $p > 0,05$).

Em conjunto, esses dados fortalecem a relevância da interação CL-mitocôndrias de eosinófilos na SHE.

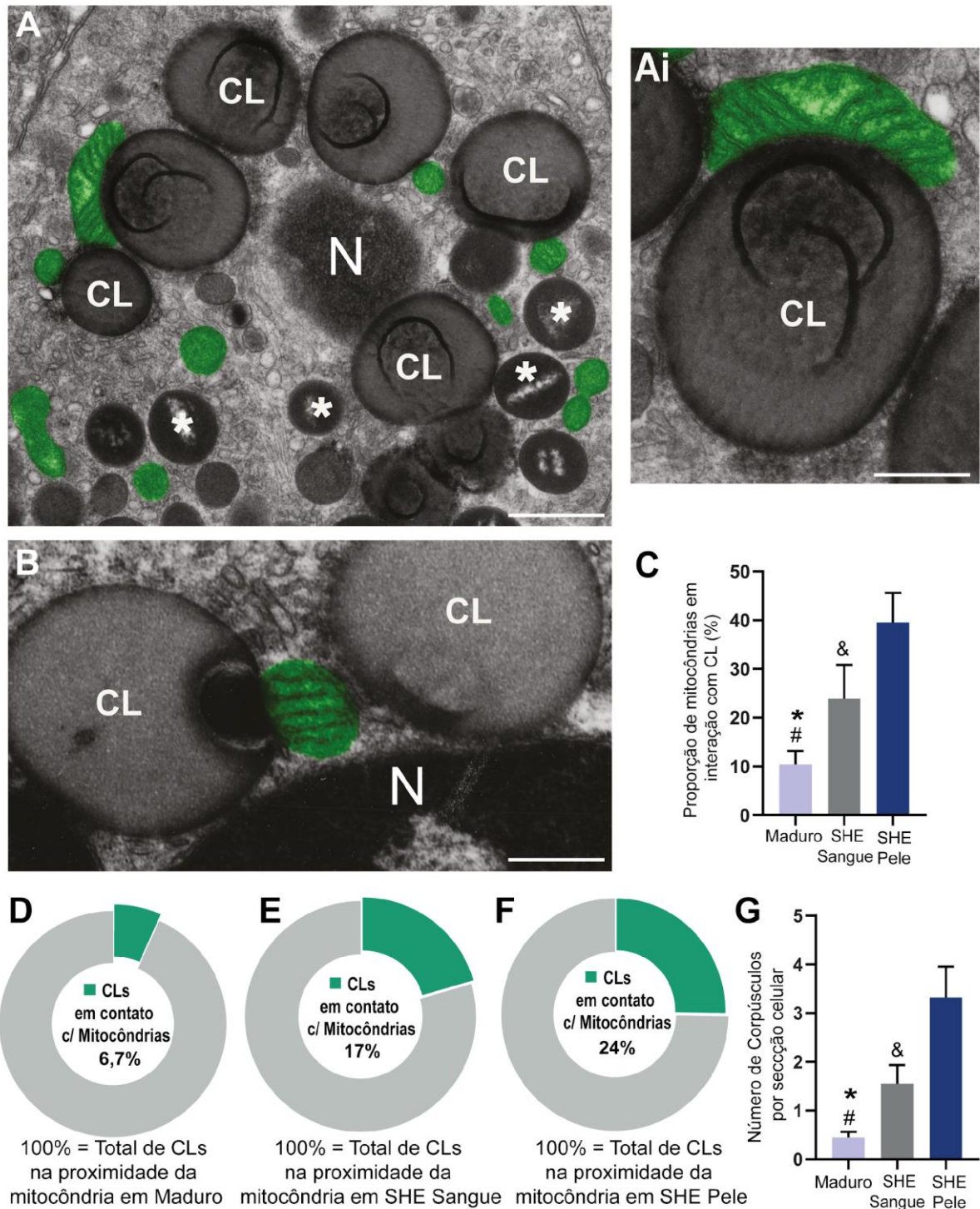


Figura 24: Interação de mitocôndrias com Corpúsculos Lipídicos em eosinófilos maduros não estimulados e na SHE: (A) Mitocôndrias próximas e em contato com CL (Ai,B) Contato mitocôndria-CL (C) Proporção de mitocôndrias em interação com CL em eosinófilos maduros e na SHE do sangue e da pele, respectivamente. (D) Proporção de CL em contato com mitocôndrias de eosinófilos maduros (E) Proporção de CL em contato com mitocôndrias de eosinófilos na SHE do sangue (F) Proporção de CL em contato com mitocôndrias de eosinófilos na, SHE da pele. (G) Número de CL por secção celular nos grupos

5.2.7 Na SHE Mitocôndrias estão Próximas de Grânulos Mobilizados

Ao observar a distribuição das mitocôndrias pelo citoplasma das células foi visto que estavam com frequência próximas de grânulos citoplasmáticos número expressivo de mitocôndrias era encontrada próxima a grânulos citoplasmáticos (Fig. 25A).

Dessa forma, para melhor investigar esses aspectos, foi feita a análise da interação que mitocôndrias estabelecem com grânulos levando-se em conta o grau de mobilização que eles apresentavam. Foi visto que grânulos intactos interagem menos com mitocôndrias, sendo essa interação significativamente maior com mitocôndrias em SHE-sangue (sangue= $39,5 \pm 8,4\%$; pele= $22,7 \pm 8,4\%$, Figs. 25B,C; média \pm EP, $p > 0,02$). Enquanto que os grânulos mobilizados interagem com maior frequência com mitocôndrias (sangue= $90,2 \pm 3\%$; pele= $84,2 \pm 3\%$, Figs. 25B,F; média \pm EP; $p > 0,4$) sem diferença significativa entre os grupos. O que leva a hipótese de que haja envolvimento das mitocôndrias no processo de mobilização de grânulos específicos de eosinófilos.

5.2.8 Na SHE Grânulos Mobilizados Interagem mais com Mitocôndrias

Após observar alguns aspectos ultraestruturais relevantes a respeito da relação entre grânulos e mitocôndrias, mais análises a respeito dessa interação foram feitas. Ao avaliar a proximidade de grânulos com mitocôndrias, foi discriminado qual destes estabeleciam contato com elas, levando-se em consideração a forma pela qual foram classificados.

A proporção de grânulos dentre aqueles que estavam próximos que estabeleciam contato com as mitocôndrias foi quantificada. SHE-sangue apresentou uma proporção 32% maior de grânulos intactos em contato com mitocôndrias em comparativo a SHE-pele (sangue= $40 \pm 9,9\%$, Fig. 25D; pele= $11 \pm 7\%$, Fig. 25C,G; média \pm EP; $p > 0,05$). Já em relação aos grânulos mobilizados não houve diferença entre os grupos, mas foi constatada uma maior proporção de grânulos mobilizados em contato com mitocôndrias na SHE-sangue (sangue= $8 \pm 2,9\%$, figura 25E; pele= $8,5 \pm 3,3\%$; figura 25D e H; média \pm EP; $p > 0,05$). Esses achados reforçam o envolvimento de mitocôndrias na mobilização de grânulos.

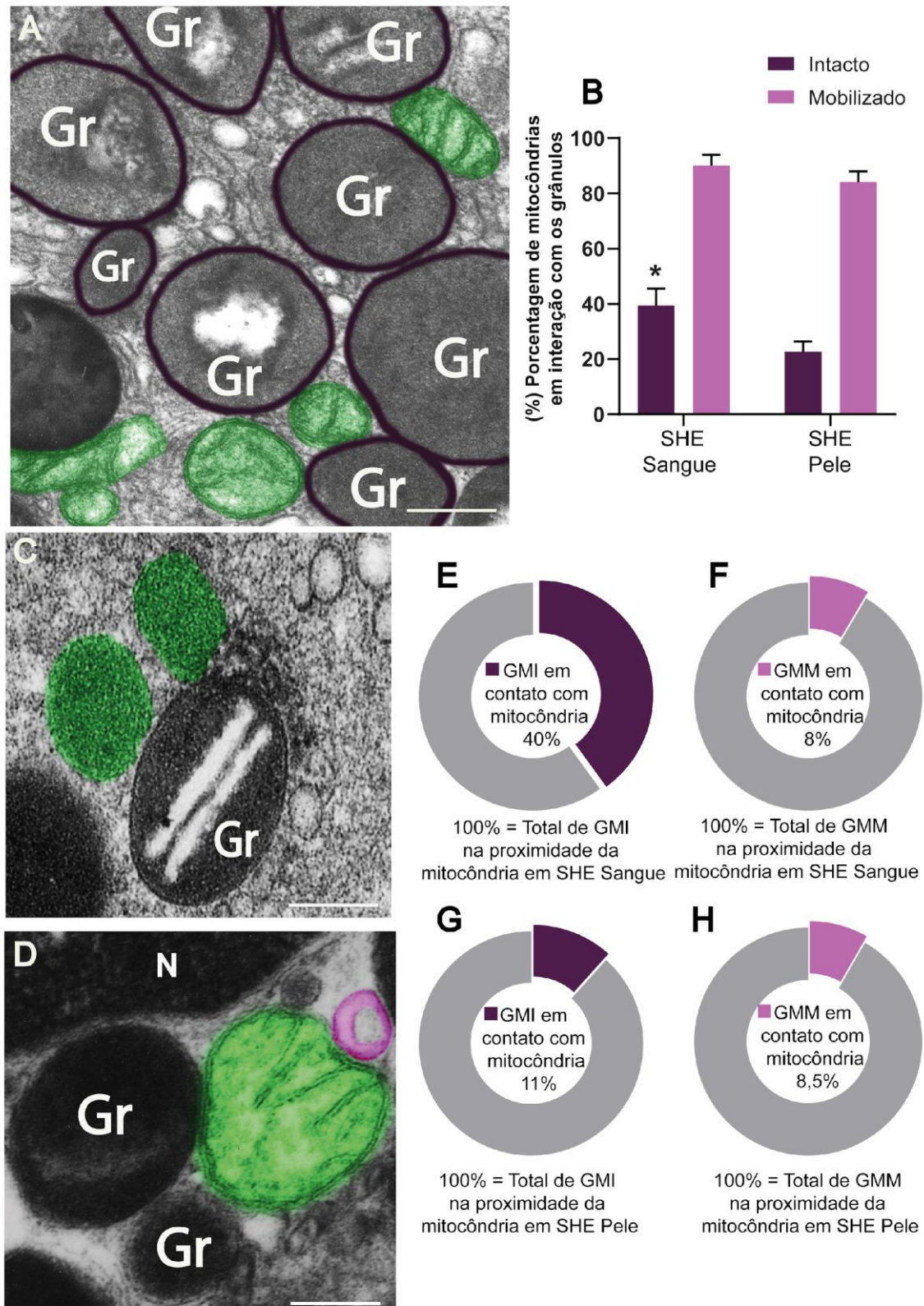


Figura 25- Interação de mitocôndrias com grânulos específicos em eosinófilos na SHE:

(A) Mitocôndrias (em verde) em proximidade e contato com grânulos. (B) Figura da porcentagem de mitocôndrias em interação com grânulos nos grupos. (C) Mitocôndrias (em verde) interagindo com grânulos maduros intactos. (D) Mitocôndrias (em verde) interagindo com grânulos maduros mobilizados. (E) Proporção de grânulos maduros intactos em contato com mitocôndrias em SHE sangue. (F) Proporção de grânulos maduros mobilizados em contato com mitocôndrias em SHE sangue. (G) Proporção de grânulos maduros intactos em contato com mitocôndrias em SHE da pele. (H) Proporção de grânulos maduros mobilizados em contato com mitocôndrias em SHE pele. Barra: (A) 700nm, (C) 500nm, (D) 700nm.

5.2.9 Mitocôndrias em Proximidade com EoSVs Ocorre na SHE da Pele

Ao constatar que mitocôndrias tem maior interação com grânulos mobilizados, o próximo passo foi avaliar EoSVs, uma vez que estas estão diretamente ligadas ao processo secretório

Inicialmente, foi avaliada a interação dessas vesículas com mitocôndrias, na qual foi observada uma expressiva interação em ambos os tipos de SHE (Figura 26A), com destaque para uma parcela significativa dessas vesículas estabelecendo contato com a membrana mitocondrial (Figs. 26Ai,B), sendo essa interação mais significativamente vista na pele (maduro= $52,3 \pm 5\%$; sangue= $65,4 \pm 5,3\%$; pele= $77,1 \pm 3,3\%$, Figs. 25A,C; média \pm EP $p > 0,0001$).

5.2.10 O Contato de EoSVs com Mitocôndrias Aumenta em Contextos de SHE

Ao se observar a quantidade de EoSVs que estabelecem contato com mitocôndrias, dentre o total que se localizavam próximos a elas, observa-se que ocorre um expressivo aumento dessa interação na SHE em relação ao grupo maduro em cerca de 20% (maduro= $2,3 \pm 2\%$; sangue= $22,8 \pm 1,2\%$; pele= $23,4 \pm 1,9\%$; Figs. 26Ai,B,D-F; média \pm EP; $p > 0,05$).

Esses resultados suportam a ideia de que mitocôndrias possam estar envolvidas no processo secretório de eosinófilos por PMD.

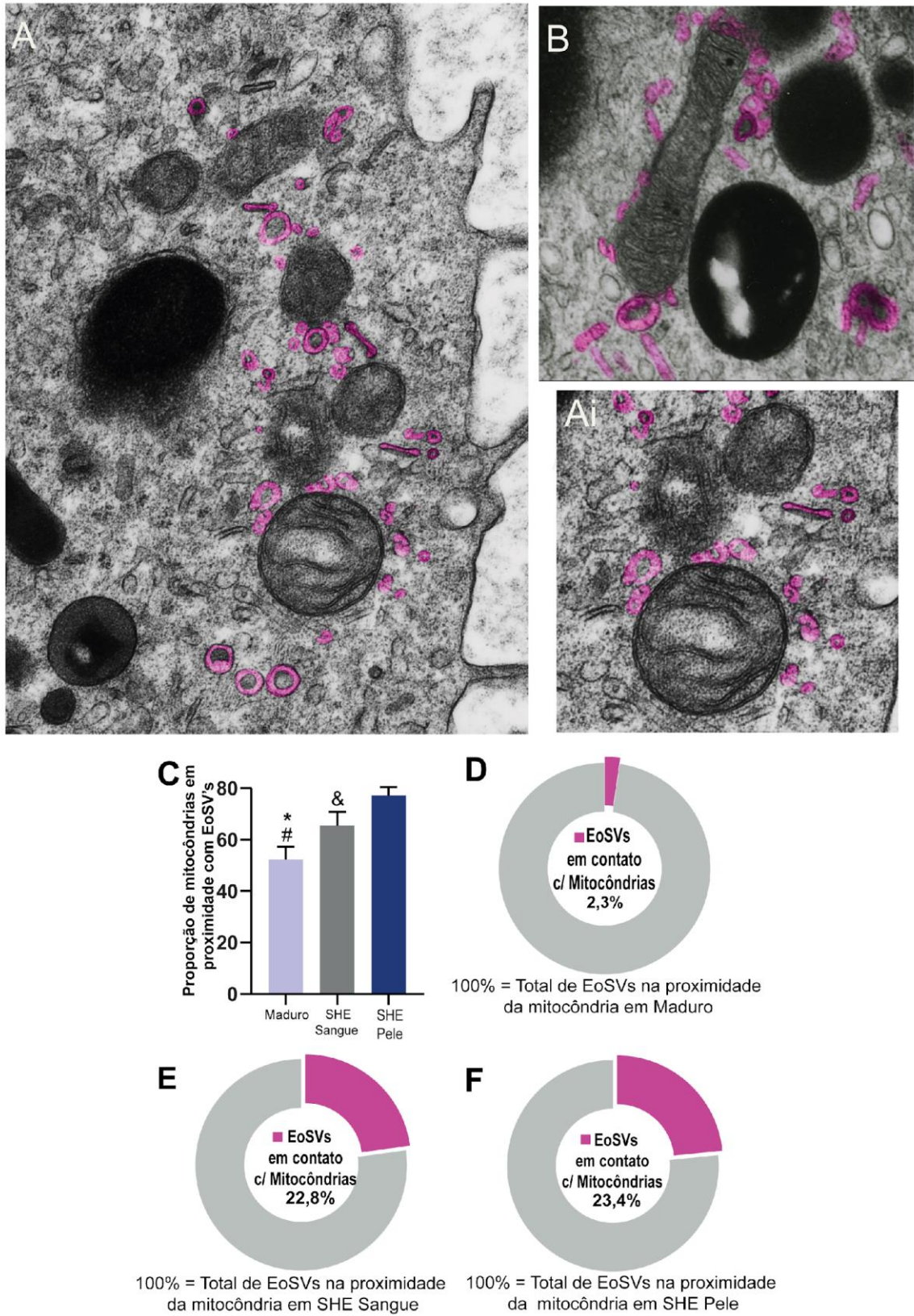


Figura 26-Interação de mitocôndrias com EoSVs específicos em eosinófilos na SHE: (A) Mitocôndrias em proximidade e contato com EoSVs. (Ai,B) Mitocôndrias em contato com EoSVs.(C) Porcentagem de mitocôndrias em interação com grânulos nos grupos. (D) Proporção de EoSVs em contato com mitocôndrias em eosinófilos maduros. (E)Proporção de EoSVs em contato com mitocôndrias em eosinófilos envolvidos na SHE do sangue. (F) Proporção de EoSVs em contato com mitocôndrias em eosinófilos envolvidos na SHE da pele. Barra: (A) 400nm, (Ai) 700 nm, (B) 750nm

5.2.11 Características de Eosinófilos nos Contextos de SHE

Os dados quantitativos referentes às relações de proximidade que as mitocôndrias estabelecem com as outras organelas permitiram a realização de análises estatísticas multivariadas, capazes de definir as características determinantes e discriminantes de eosinófilos em ambos os tipos de SHE. Nas análises de componentes principais, as informações quantitativas contidas nas variáveis originais foram condensadas em um conjunto menor de variáveis estatísticas (componentes). Com o objetivo de identificar as variáveis mais importantes em cada doença, ou seja, aquelas que explicam a maior parte da variância total dos dados foram destacadas neste estudo as três variáveis que apresentaram os maiores coeficientes na primeira componente. Assim, de acordo com os parâmetros estabelecidos, foi observado que de acordo com o microambiente no qual se encontram, os eosinófilos apresentam diferentes características determinantes. No grupo maduro, a primeira componente explica 30,3% da variância total e as organelas mais importantes foram: corpúsculo lipídico, grânulo intacto e vesícula sombrero de eosinófilos (Tabela 2). Na HES-sangue, a primeira componente foi responsável por 23,1% da variância total, e as estruturas celulares mais importantes foram: retículo endoplasmático, grânulo intacto e EoSV (Tabela 2). Em relação à SHE-pele, a primeira componente explica 29,3% da variância total, sendo as organelas mais importantes: membrana plasmática grânulo intacto e grânulo mobilizado (Tabela 2). Portanto, a proximidade mitocôndria-grânulo intacto teve um importante papel descritivo para os três grupos. Além disso, para os grupos maduro e HES-sangue, a proximidade mitocôndria-vesícula sombrero de eosinófilos também se destaca com um importante papel no estabelecimento da primeira componente, diferentemente do SHE-pele, cujas demais variáveis de destaque foram a proximidade mitocôndria-membrana plasmática e mitocôndria-grânulo mobilizado.

Síndrome	Nº Micrografias	Estruturas celulares com maior peso na 1º componente						% da variância explicada pela 1º componente
		Membrana Plasmática	Corpúsculo Lipídico	Reticulo Endoplasmático	Grânulo Intacto	Grânulo Mobilizado	Veículo Sombbrero de Eosinófilo	
MADURO	16		■		■			30,31
HES-PELE	24	■				■	■	29,30
HES-SANGUE	26			■	■		■	23,09

Tabela 2- Análise de PCA para identificar quais as interações estabelecidas entre as mitocôndrias eosinofílicas e outras organelas celulares que são responsáveis pela maior variação observada e potencialmente capazes de classificar (determinar) a ocorrência de

HES-sangue do grupo maduro (controle), foram ajustados modelos de Regressão Logística com os dados quantitativos relacionados às análises de proximidade. Desse modo, foi possível identificar, dentre as organelas avaliadas, aquelas que possuem um papel significativo nessa distinção. Para o SHE-pele as variáveis significativas foram a proximidade mitocôndria-corpúsculo lipídico e mitocôndria-retículo endoplasmático, com R^2 (Índice de Nagelkerke) de 0,8 e um percentual de acerto da predição de 90% (Tabela 3). A exponencial dos coeficientes estimados (*OddsRatio*) para a proximidade mitocôndria-corpúsculo lipídico e mitocôndria-retículo endoplasmático foram de 26,8 e -15,1, respectivamente (Tabela 3). Percebe-se que *OddsRatio* para a proximidade mitocôndria-corpúsculo lipídico é positivo, o que indica que na SHE-Pele há uma maior prevalência de corpúsculos lipídicos próximos às mitocôndrias em comparação com o maduro. Por outro lado, um aumento no número de retículos endoplasmáticos próximos às mitocôndrias reduz a chance de uma amostra ser de SHE-Pele em comparação com o maduro.

Para o SHE-Sangue as variáveis significativas no modelo com *OddsRatio* negativo foram a proximidade mitocôndria-membrana plasmática (-9,5) e mitocôndria-núcleo (-12,1) e as variáveis significativas no modelo com *OddsRatio* positivo foram a proximidade mitocôndria-mitocôndria (5,8) e mitocôndria-vesícula sombrero (4,6) (Tabela 3). O modelo apresentou um R^2 (Índice de Nagelkerke) de 0,76 e um percentual de acerto da predição de 88,1% (Tabela 3). A partir destes resultados é possível afirmar que um maior número de mitocôndrias e vesículas sombrero próximas às mitocôndrias aumenta a chance de uma amostra ser de SHE-Sangue em comparação com o Maduro, enquanto uma maior proximidade das mitocôndrias com a membrana plasmática e com o núcleo reduz a chance de uma amostra ser de SHE-Sangue, também em relação ao maduro.

Síndrome	Nº Micrografias		ODDs Ratio (%)					R ² (Nagelkerke)	% de acerto	
	Síndrome	Maduro	Mitocôndria	Corpúsculo Lipídico	Reticulo Endoplasmático	Núcleo	Veículo Sombreiro de Eosinófilo			Membrana Plasmática
HES-PELE	24	16	-	26,8	-15,1	-	-	-	0,80	90,0
HES-SANGUE	26	16	5,8	-	-	-12,1	4,6	-9,5	0,76	88,1

Tabela 3- Regressão Logística da ocorrência de SHE-Sangue e a SHE-Pele em função das interações estabelecidas entre as mitocôndriaseosinofílicas e outras organelas celulares

Esses resultados contribuem para direcionar os estudos a respeito das interações mitocondriais mais significativas para cada contexto em que o eosinófilo está envolvido.

5.2.12 Alterações Mitocondriais no Contexto da SHE

Para realização dessa análise foram consideradas cinco das alterações mais tipicamente encontradas em mitocôndrias em diversos contextos: compartimentalização, formação de corpos elétron-densos, vesiculação fissão e fusão. Dessa apenas três foram observadas em mitocôndrias de eosinófilos na SHE: compartimentalização (Fig. 27A), formação de corpos elétron-densos (Fig. 27B) e vesiculação (Fig. 27C).

Na SHE-pele, o processo de compartimentalização foi observado em cerca de 3%, do total de mitocôndrias, um valor 300% maior em comparação ao maduro, no sangue esse processo não foi observado.

Já o processo de formação de corpos elétron-densos foi observado em 5,6% do total de mitocôndrias do sangue e 13,3 do total da pele (sangue=5,6 ± 0,3%; pele=13,3 ± 0,1%; média ± EP; p>0,05). Esses valores indicam uma redução de 46,7% no sangue e um aumento de 73,3% na pele em comparação ao grupo maduro.

Foi observado que em torno de 10% do total de mitocôndrias em ambos os grupos apresentaram vesiculação (sangue= $9,5 \pm 0,2\%$; pele= $9,7 \pm 0,2\%$; media \pm EP; $p > 0,05$), esses valores indicam um aumento de 9,1 % no sangue e 72,7% na pele em relação ao grupo maduro.

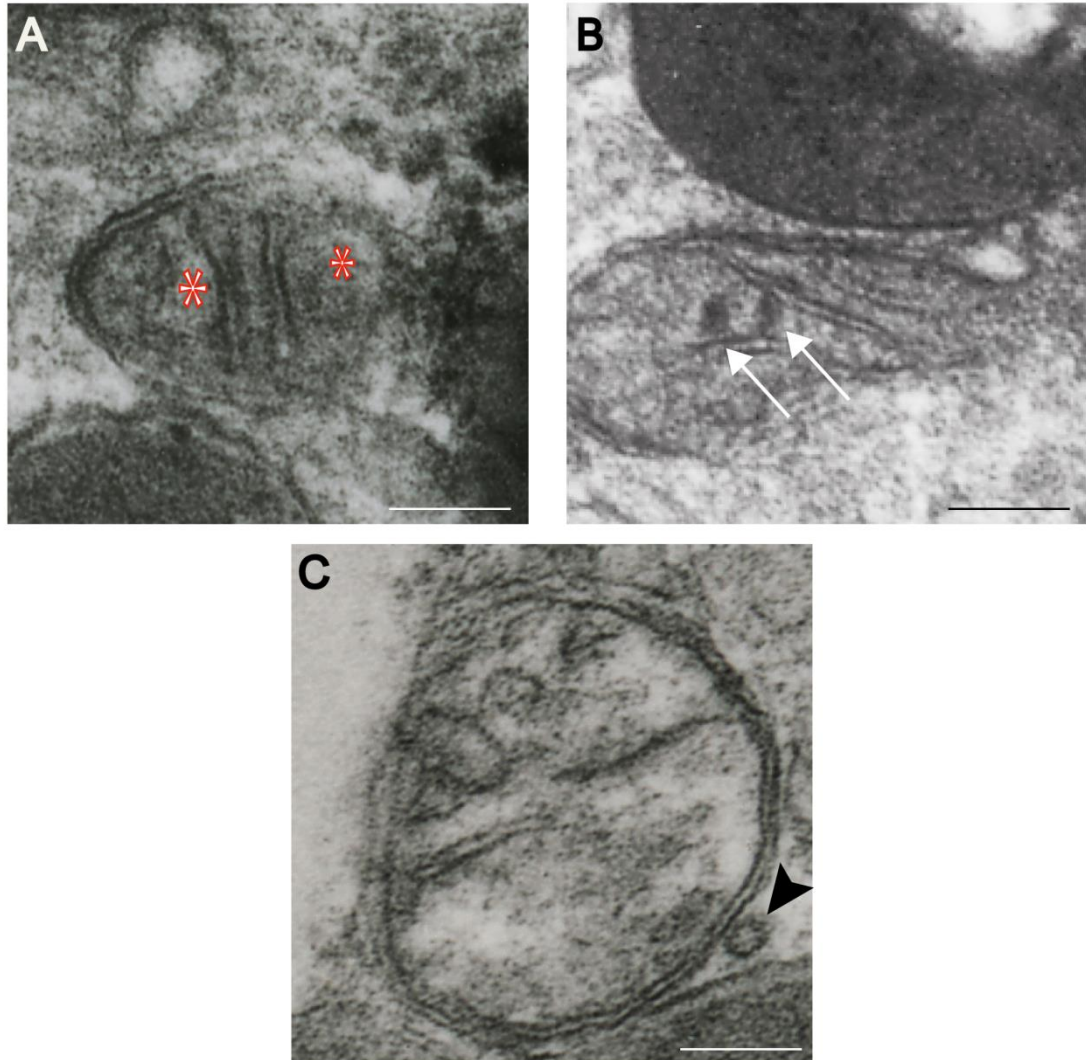


Figura 27: Alterações mitocondriais em eosinófilos envolvidos na SHE: (A) Compartimentalização mitocondrial (marcada pelo asterisco em vermelho). (B) Formação de corpos elétron-densos (indicado pela seta em branco). (C) Vesiculação mitocondrial (indicada pela cabeça de seta). Barras: (A) 650nm, (B) 700nm, (C) 800nm.

6. DISCUSSÃO

Atualmente, os diversos estudos que visam compreender melhor a atividade funcional de eosinófilos em patologias têm como foco a sua capacidade secretora, bem como a dinâmica funcional dos grânulos específicos, responsáveis pelo armazenamento e liberação de inúmeras citocinas e outros mediadores da resposta imune. (MELO; WELLER, 2018) Na última década, vários estudos apontaram o papel relevante de mitocôndrias na regulação e funcionamento de células do sistema imune, como a diferenciação de linfócitos e macrófagos (ANGAJALA, 2018; RONGVAUX, 2018). Alterações expressivas de vias metabólicas mitocondriais parecem contribuir para as respostas dessas células em situações patológicas. Entretanto, pouco se sabe a respeito do papel das mitocôndrias e de sua dinâmica em eosinófilos, com alguns estudos correlacionando estas organelas com a manutenção da sobrevivência de eosinófilos (Peachman, 2001)(ILMARINEN, 2014). Existem ainda questões fundamentais que permanecem não respondidas. Por exemplo, pouco se sabe se a população mitocondrial se altera durante o processo de maturação do eosinófilo e se essas organelas, em células maduras, respondem a diferentes microambientes ou situação de doença. Na literatura, não existem estudos quantitativos com foco na população de mitocôndrias de eosinófilos e suas características ultraestruturais.

No presente estudo, utilizamos a MET aliada à análises quantitativas para responder essas questões. Mitocôndrias são organelas que sofrem constante remodelagem de suas cristas associada com sua atividade funcional. Assim, para mitocôndrias, forma e função estão intimamente relacionadas e o presente estudo utilizou uma extensa análise ultraestrutural para entender a dinâmica mitocondrial de eosinófilos.

Drásticas alterações morfológicas ocorrem durante o processo de maturação de eosinófilos, como a redução do aparato secretor e a alteração da morfologia de grânulos, como demonstrado em estudos anteriores (DVORAK; WELLER, 2000). Eosinófilos imaturos apresentam grânulos específicos imaturos, os quais sofrem um processo progressivo de condensação e cristalização (MELO; WELLER, 2018). Esse processo leva à formação do cristalóide, caracterizando assim o grânulo específico maduro. Em culturas, eosinófilos humanos com predominância de grânulos sem cristalóide e com outras características associadas à imaturidade (núcleo pouco segmentado, RER e Golgi desenvolvidos) foram assim classificados como imaturos

enquanto o aparecimento de grande proporção de grânulos com cristaloide no citoplasma caracterizou eosinófilos maduros (Figs 2, 4 e 5).

Em culturas de eosinófilos humanos, o número e área mitocondriais foram avaliados em eosinófilos caracterizados como imaturos e maduros. Nossos resultados mostraram que ocorre redução significativa da população mitocondrial em células maduras. Essa redução (50%) é demonstrada tanto por alterações significativas na área média mitocondrial que reduz em eosinófilo maduros quanto pelo aumento da circularidade nessas células. Em eosinófilos sofrendo maturação, as análises também revelaram que as mitocôndrias exibem cristas predominantemente lamelares as quais oferecem grande área de superfície para realização dos processos metabólicos (Fig. 21), o que aponta para uma alteração e adaptação metabólica mitocondrial de acordo com a resposta ao qual o eosinófilo desempenha.

Estudos anteriores destacam o papel da mitocôndria como organela central no controle e balanço do desenvolvimento de células tronco mieloides (BONORA, 2015). Dessa forma, a densa população de mitocôndrias em eosinófilos imaturos parece estar relacionada com papel relevante no processo de maturação do eosinófilo. A disponibilidade de maior área de superfície mitocondrial também encontra-se associada ao processo de adaptação e alterações metabólicas das mitocôndrias (ROY, 2019).

Um aspecto que vem despertando muita atenção na literatura é a associação das mitocôndrias com outras organelas. Já é bem conhecida na Biologia Celular a interação mitocôndria-retículo endoplasmático e o fato das mitocôndrias alterarem constantemente seu posicionamento no citoplasma das células (MELO; WELLER, 2018). Mais recentemente, destacou-se a habilidade das mitocôndrias estabelecerem interações funcionais de proximidade e contato com diversos microdomínios moleculares e com outras organelas (ANTONICKA, 2020). As interações de mitocôndrias com determinadas organelas como RE e CL, por exemplo, podem ser indicativas de ativação de vias de sinalização (STURMEY, 2006; VERMA, 2011).

No presente estudo foi feita análise da proximidade das mitocôndrias com todas as outras organelas de eosinófilos que consistia na análise individual de cada mitocôndria em cada seção celular. Para isso, inicialmente foi estabelecido um quadrante radial a partir do centro da mitocôndria analisada que apresentava duas

vezes o seu diâmetro (Figura 9). Em seguida, todas as organelas que estavam dentro deste quadrante radial (i.g. zona de proximidade) foram quantificadas. Essas análises poderiam nos fornecer uma ideia das interações e possíveis funções das mitocôndrias nos grupos avaliados. Foi observada expressiva interação com Golgi e RE o que corrobora com a necessidade que essas células têm de intensa atividade secretora para produzir os produtos necessários para completar a maturação celular. Além disso, foram observadas interações com outras mitocôndrias o que pode ser indicativo de ocorrência de fissão e fusão mitocondrial em resposta a adaptação celular ao microambiente, como observado anteriormente (MORO, 2020). No entanto, o dado mais intrigante a respeito dessas relações de proximidade que a mitocôndria estabelece está relacionado ao fato de quase a totalidade dos grânulos específicos de eosinófilos estarem próximos de mitocôndrias. Como esses grânulos são importantes para a resposta secretora de eosinófilos nos contextos ao qual estão inseridos (MELO, 2008), essa interação sugere a relevância das mitocôndrias no processo de desenvolvimento e ativação do grânulo o que levou à análises adicionais para solidificar essa hipótese.

Avaliamos se as mitocôndrias interagem preferencialmente com grânulos específicos imaturos ou grânulos específicos maduros em eosinófilos imaturos. A partir da observação que ocorre preferencialmente interação de mitocôndrias com grânulos em estágio inicial de maturação, é possível sugerir que as mitocôndrias possam contribuir para a maturação desses grânulos, auxiliando na resposta que essas células efetuam de acordo com o contexto ao qual estão inseridas. Já para eosinófilos maduros, foi observado que mitocôndrias interagem preferencialmente com grânulos mobilizados. Além disso algumas alterações foram frequentemente vistas em mitocôndrias de acordo com o estímulo em que sofre, como é o caso da compartimentalização (OLZMANN; P., 2019), vesiculação (SUGIURA, 2014), formação de corpos elétron-densos (GARCIA, 2018) e fusão e fissão (BABBAR; SHEIKH, 2013). No caso de eosinófilos maduros e imaturos foi frequente a ocorrência de vesiculação, compartimentalização e formação de corpos elétron-densos. Essas alterações ainda não são bem compreendidas, mas estudos futuros podem ajudar a elucidar a contribuição delas para o funcionamento mitocondrial.

Além da compreensão do funcionamento mitocondrial em células madura e imaturas é importante compreender o papel dessa funcionalidade em eosinófilos

envolvidos em patologias. Aqui, estudamos as mitocôndrias no contexto da SHE, uma vez que é conhecida pela literatura que essa síndrome constitui um excelente modelo para estudos de eosinófilos (KLION, 2020). No presente estudo, foram utilizadas amostras coletadas do sangue e da pele de um mesmo paciente acometido por essa doença, e para fins comparativos, foram feitas análises iguais às aquelas anteriores para eosinófilos imaturos e maduros de pacientes saudáveis.

As avaliações morfométricas em conjunto mostraram que a densidade de mitocôndrias não se altera em eosinófilos circulantes comparados aos do microambiente tecidual. Apesar do número total de mitocôndrias sofrer redução (do sangue para o tecido), não ocorreu variação da área total e da circularidade. Desta forma, reforçamos aqui que estudos quantitativos de mitocôndrias não devem levar em consideração apenas o número dessas organelas. Mitocôndrias têm tamanho muito variável e, portanto, a área mitocondrial deve ser considerada. No caso, além da área a circularidade também foi considerada como parâmetro de avaliação.

Por outro lado, a análise de padrões de cristas revelou que as mitocôndrias respondem à situação de doença com modificações morfológicas de suas cristas. Encontramos em eosinófilos de SHE (tanto em eosinófilos do sangue como do tecido), mitocôndrias com um padrão de cristas não identificado em eosinófilos imaturos nem em eosinófilos maduros do sangue periférico de pacientes saudáveis. Esse padrão se caracterizou por um arranjo de cristas lamelares e tubulares em uma mesma mitocôndria (Fig. 22). Desta forma, as mitocôndrias de eosinófilos sofrem alterações estruturais relacionadas com ativação e resposta celular (MELO, R.C.N ET AL., 2013). Eosinófilos de pacientes com SHE são reconhecidos por serem naturalmente ativados. A ativação dessas células é demonstrada tanto metabolicamente como estruturalmente (MELO, R.C.N.; WELLER, P.F., 2016). Esses eosinófilos têm perfil morfológico de desgranulação por piecemeal tanto no sangue como na pele, sendo significativamente mais abundante nessa última e produzem quantidade expressiva de mediadores inflamatórios relacionada com a formação acentuada de CLs (BOZZA, 1998)

As interações estabelecidas por mitocôndrias com outras organelas citoplasmáticas foram também investigadas no citoplasma de eosinófilos recrutados na SHE. Constatou-se que as interações mais frequentes ocorrem com retículo, outras mitocôndrias, mas principalmente com CL, grânulos específicos e EoSVs. Essas três

últimas interações foram avaliadas mais detalhadamente. A interação CL-mitocôndria, reconhecida na literatura em outros tipos celulares (STURMEY, 2006), chamou a atenção no contexto da SHE, uma vez que foi significativamente mais frequente em eosinófilos teciduais. Este achado reforça a influência do microambiente na determinação das interações.

A interação com grânulos secretores também chamou a atenção pelo fato de ter sido significativamente maior com grânulos sofrendo liberação de seus conteúdos. Além disso, mitocôndrias também interagem consideravelmente com EoSVs, sistema vesicular envolvido no transporte de compostos armazenados nos grânulos. Esses achados levam à seguintes perguntas: mitocôndrias participam do processo de desgranulação de eosinófilos durante processos inflamatórios/respostas imunes? O presente trabalho não pode responder essa questão levando-se em consideração apenas as análises ultraestruturais. No entanto, nossos dados oferecem uma nova perspectiva sobre o papel das mitocôndrias e estudos futuros são necessários para investigar se essas organelas participam da resposta secretora de eosinófilos.

Ao analisarmos a estrutura mitocondrial em detalhes, observamos também que as mitocôndrias mostram compartimentalização e são capazes de sofrerem eventos de vesiculação. Interessantemente, esses aspectos são significativamente maiores no contexto da SHE em comparação com eosinófilos em cultura e maduros do sangue de pacientes saudáveis, desta forma refletindo a resposta mitocondrial à situação de ativação, através do remodelamento e rearranjo do número de cristas.

Estudos recentes mostram que as mitocôndrias são potencialmente essenciais para o melhor entendimento e funcionamento das células imunes e seus contextos de ativação.

Em resumo, no presente trabalho, algumas descobertas merecem destaque, tais como: 1) a população mitocondrial diminui significativamente durante o contexto de maturação e aumenta em condições patológicas; 2) à medida que a célula entra em maturação, as cristas mitocondriais diminuem em número bruto e em distribuição por área mitocondrial mas aumenta durante a SHE 3) Todos os contextos favorecem remodelação para a morfologia lamelar de crista, mas ocorre a indução da formação de cristas de padrão misto nos grupos de SHE de forma consistente 4) as mitocôndrias

interagem com outras organelas, notadamente com grânulos secretores e EoSVs durante a maturação e ativação dos eosinófilos.

Em conclusão, identificamos que os contextos de maturação e ativação (patologia) levam a uma alteração significativa da população de mitocôndrias, o que interfere na dinâmica mitocondrial nos eosinófilos humanos. O aumento da remodelação das cristas e dos contatos interorganelas, incluindo as interações mitocôndrias-grânulos secretores e mitocôndrias-EoSVs, podem potencialmente influenciar as respostas imunes e de maturação dos eosinófilos. A compreensão de como a dinâmica mitocondrial contribui para as funções imunológicas dos eosinófilos é um campo aberto e interessante a ser explorado.

7. CONCLUSÕES

- O processo de maturação do eosinófilos humanos leva à redução acentuada de sua população de mitocôndrias;
- Durante o processo de maturação de eosinófilos humanos, as mitocôndrias remodelam suas cristas e estabelecem interação significativa com grânulos de secreção em formação, indicando um possível papel na granulogênese;
- A densidade de mitocôndrias não se altera em eosinófilos do sangue periférico e teciduais maduros ativados no contexto da SHE. No entanto, as mitocôndrias remodelam suas cristas em resposta à essa ativação e interagem significativamente com EoSVs, CLs e grânulos em processo de secreção;
- Mitocôndrias de eosinófilos sofrem alterações estruturais e estabelecem interações com outras organelas tanto durante o desenvolvimento da célula como em resposta à ativação celular. Tais interações variam com o microambiente em que o eosinófilo está localizado;
- Em conjunto, o presente trabalho demonstrou que a população de mitocôndrias de eosinófilos participam ativamente tanto do processo de maturação dessas células como de suas respostas em contexto de ativação. Essa participação é evidenciada por alterações de ultraestrutura e interações com organelas, particularmente com grânulos de secreção e CLs. Nossos dados ressaltam as mitocôndrias de eosinófilos como organelas multifuncionais com potencial participação em respostas imunes.

REFERÊNCIAS

AGAR, H. D.; DOUGLAS, H. Studies on the cytological structure of yeast: electron microscopy of thin sections. **Journal of Bacteriology**, v.73, n.3, p.365, 1957.

AGRAWAL, A.; MABALIRAJAN, U. Rejuvenating cellular respiration for optimizing respiratory function: targeting mitochondria. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular**, v.310, n.2, p.103-113, 2016.

AKUTHOTA, P. e. a. MHC Class II and CD9 in human eosinophils localize to detergent-resistant membrane microdomains. **American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology**.46, n. n.2, p. p.188-195, 2012.

AL-RABIA, M.; BLAYLOCK, M.; SEXTON, D.; THOMSON, L. *et al.* Granule protein changes and membrane receptor phenotype in maturing human eosinophils cultured from CD34+ progenitors. 33, n. 5, p. 640-648, 2003.

ALTMANN, R. **Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen**. Veit & Company, 1890. v. 1n.1.

ANGAJALA, A. e. a. Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. **Frontiers Immunology**, v.9, n.1, p.1-19, 2018.

ANTONICKA, H. e. a. A high-density human mitochondrial proximity interaction network. **Cell Metabolism**, v.32, n.3, p.479-497, 2020.

ARCHER, S. L. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. **New England Journal of Medicine**, v.369, n.23, p.2236-2251, 2013.

ARCHIBALD, J. M. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. **Current Biology**, v.25, n.19, p.911-921, 2015.

BABBAR, M.; SHEIKH, M. S. Metabolic stress and disorders related to alterations in mitochondrial fission or fusion. **Molecular Cellular Pharmacology**, v.5, n.3, p. 109, 2013.

BENDA, C. Weitere mitteilungen über die mitochondria. **Verh Dtsch Physiol Ges**, p.376-383, 1898.

BHOLA, P. D.; LETAI, A. Mitochondria-Judges and Executioners of Cell Death Sentences. **Molecular Cell**, v.61, n.5, p.695-704, Mar 3 2016.

BONORA, M. e. a. Mitochondrial control of hematopoietic stem cell balance and hematopoiesis. **Frontiers in Biology**, v.10, n. n.2, p. p.117-124, 2015.

BOZZA, P. T. e. a. Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. **Journal of Leukocyte Biology**, v.64, n.4, p.563-569, 1998.

BYRNE, J. J. e. a. Disruption of mitochondrial dynamics affects behaviour and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Cellular Molecular Life Sciences** v.76, n.10, p.1967-1985, 2019.

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

CHU, V. T.; BEREK, C. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. **Immunological Reviews**, v.251, n.1, p.177-188, 2013.

CHUSID, M. J. Eosinophils: friends or foes? **The Journal of Allergy Clinical Immunology: In Practice** v.6, n.5, p.1439-1444, 2018.

CLOONAN, S. M.; CHOI, A. M. Mitochondria: commanders of innate immunity and disease? **Current Opinion Immunology**, v.24, n.1, p.32-40, 2012.

CLOONAN, S. M.; CHOI, A. M. Mitochondria: sensors and mediators of innate immune receptor signaling. **Current Opinion Microbiology**, v.16, n.3, p.327-338, 2013.

CLOONAN, S. M.; CHOI, A. M. Mitochondria in lung disease. **J Clin Invest**, 126, n. 3, p. 809-820, 2016.

CRUZ, C. D.; KANG, M. J. Mitochondrial dysfunction and damage associated molecular patterns (DAMPs) in chronic inflammatory diseases. **Mitochondrion**, v.41, n. n.1, p. p.37-44, 2018.

DETMER, S. A.; CHAN, D. C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, n.11, p.870-879, Nov 2007.

DEWSON, G. e. a. Interleukin-5 inhibits translocation of Bax to the mitochondria, cytochrome c release, and activation of caspases in human eosinophils. **Journals Blood - American Society of Hematology**, v.98, n.7, p.2239-2247, 2001.

DOBSON, A. J.; BARNETT, A. G. **An introduction to generalized linear models**. CRC press, 2018.

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

DVORAK, A. M. e. a. Ultrastructure of eosinophils and basophils stimulated to develop in human cord blood mononuclear cell cultures containing recombinant human interleukin-5 or interleukin-3. **Laboratory Investigation**, v.61, n.1, p.116-132, 1989.

FULKERSON, P. C.; ROTHENBERG, M. E. Eosinophil development, disease involvement, and therapeutic suppression. *In: Advances in Immunology*, 2018. v.138, p.1-34.

GAO, M. e. a. The biogenesis of lipid droplets: Lipids take center stage. **Progress in Lipid Research**, v.75, 2019.

GARCIA, I. e. a. Oxidative insults disrupt OPA1-mediated mitochondrial dynamics in cultured mammalian cells. **Redox Report**, v.23, n.1, p.160-167, 2018.

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

GRAZIOLI, S.; PUGIN, J. Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns: From Inflammatory Signaling to Human Diseases. **Frontiers in Immunology**, v.9, n.1, p.1-17, 2018.

GUNTER, T. E. e. a. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. **Cell Calcium**, v.28, n.5, p.285-296, 2000.

HACKENBROCK, C. R. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. **Journal of Cell Biology**, v.37, n.2, p.345-369, 1968.

HOGAN, S. P. e. a. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clinical & Experimental Allergy** v.38, n.5, p.709-750, 2008.

HORVATH, S. E.; DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Progress in Lipid Research** v.52, n.4, p.590-614, 2013.

ILMARINEN, P. e. a. Mitochondria in the center of human eosinophil apoptosis and survival. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.3, p3952-3969, 2014.

JACOBSEN, E. A. e. a. Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? **Journal of Allergy Clinical Immunology** v.119, n.6, p.1313-1320, 2007.

JACOBSEN, E. A. e. a. The expanding role (s) of eosinophils in health and disease. **The Journal of the American Society of Hematology**, v.120, n.19, p.3882-3890, 2012.

JAIN, I. H. e. a. Genetic screen for cell fitness in high or low oxygen highlights mitochondrial and lipid metabolism. **Cell**, v.181, n.3, p.716-727, 2020.

JUGÉ, R. e. a. Quantification and characterization of UVB-induced mitochondrial fragmentation in normal primary human keratinocytes. **Scientific Reports**, v.6, n.1, p.350-365, 2016.

JUNG, Y. J. e. a. Human eosinophils show chemotaxis to lymphoid chemokines and exhibit antigen-presenting-cell-like properties upon stimulation with IFN- γ , IL-3 and GM-CSF. **International Archives of Allergy Immunology** v.146, n.3, p.227-234, 2008.

KHOURY, P. e. a. Clinical and Biological Markers in Hypereosinophilic Syndromes. **Frontiers in Medicine**, v.4, n.1, p.240, 2017.

KLION, A. D. Contributions of eosinophils to human health and disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v.15, n.1, p.179-209, 2020.

KRYSKO, D. V. e. a. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. **Trends in Immunology**, v.32, n.4, p157-164, Apr 2011.

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

LEFÈVRE, G. A. e. a. The lymphoid variant of hypereosinophilic syndrome: study of 21 patients with CD3-CD4+ aberrant T-cell phenotype. **Medicine**, v.93, n.17, p.255-266, 2014.

LEGRAND, F. e. a. The spectrum of FIP1L1-PDGFRA-associated chronic eosinophilic leukemia: new insights based on a survey of 44 cases. **Medicine**, v.92, n.5, p.1-9, 2013.

LEMASTERS, J. J. e. a. Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). **Redox Biology**, v.2, n.12, p.749-754, 2014.

LEVI-SCHAFFER, F. e. a. Human eosinophils regulate human lung-and skin-derived fibroblast properties in vitro: a role for transforming growth factor β (TGF- β). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, n.17, p.9660-9665, 1999.

LEWIS, M.; LEWIS, W. Mitochondria in tissue culture. **Science**, v.39, n.1000, p.330-333, 1914.

LOGAN, M. R. e. a. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. **Journal of Allergy Clinical Immunology** v.111, n.5, p.923-932, 2003.

MAWHORTER, S. D. e. a. Human eosinophils as antigen-presenting cells: relative efficiency for superantigen-and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.81, n.4, p.584-591, 1994.

MCNAGNY, K.; GRAF, T. Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. **The Journal of Experimental Medicine**, v.195, n.11, p.43-47, 2002.

MEHTA, M. M. e. a. Mitochondrial control of immunity: beyond ATP. **Nature Reviews Immunology**, v.17, n.10, p.608-620, 2017.

MELO, R. C. N. Células & Microscopia: princípios básicos e práticas. **UFJF: Universidade Federal de Juiz de Fora**, v.2, n.1, 2018.

MELO, R. C. N.; WELLER, P. F. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. **Histology and Histopathology** v.25, n.10, p.1341-1354, 2010.

MELO, R. C. N.; WELLER, P. F. Lipid droplets in leukocytes: Organelles linked to inflammatory responses. **Experimental Cell Research**, v.340, n.2, p.193-197, 2016.

MELO, R. C. N.; WELLER, P. F. Vesicular trafficking of immune mediators in human eosinophils revealed by immunoelectron microscopy. **Experimental Cell Research**, v.347, n.2, p.385-390, 2016.

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

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

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

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

MELO, R. C. N. e. a. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.59, n.5, p.540-556, 2011.

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

MELO, R. C. N. e. a. The internal architecture of leukocyte lipid body organelles captured by three-dimensional electron microscopy tomography. **PLoS ONE**, v.8, n.3, p.559-578, 2013.

MINGOTI, S. A. Análise de dados através de métodos estatística multivariada: uma abordagem aplicada. *In: Análise de dados através de métodos estatística multivariada: uma abordagem aplicada*, 2007. v.1, p.295-295.

MOHANTY, A. e. a. Mitochondria: the indispensable players in innate immunity and guardians of the inflammatory response. **Journal of Cell Communication Signaling**, v.13, n.1, p.303-318, 2019.

MORO, L. Mitochondria at the Crossroads of Physiology and Pathology. *Journal of Clinical Medicine*. v.9,p.1-8 2020.

MURPHY, M. P. Mitochondrial dysfunction indirectly elevates ROS production by the endoplasmic reticulum. **Cell Metabolism**, v.18, n.2, p.145-146, 2013.

MURPHY, M. P.; SIEGEL, R. M. Mitochondrial ROS fire up T cell activation. **Immunity**, v.38, n.2, p.201-202, 2013.

NAKAHIRA, K. e. a. The Roles of Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns in Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.23, n. 17, p.1329-1350, 2015.

OLZMANN, J. A.; P., C. Dynamics and functions of lipid droplets. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.20, n.3, p.137-155, 2019.

PEACHMAN, K. K. e. a. Mitochondria in eosinophils: functional role in apoptosis but not respiration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.4, p.1717-1722, 2001.

PICARD, M. e. a. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. **Journal of Applied Physiology**, v.114, n.2, p.161-171, 2013.

PORTER, L. e. a. Metabolic Profiling of Human Eosinophils. **Frontiers Immunology**, v.9, n.1, p.1-11, 2018.

REHER, T. M. e. a. Incomplete activation of human eosinophils via the histamine H4-receptor: evidence for ligand-specific receptor conformations. **Biochemical Pharmacology**, v.84, n.2, p.192-203, 2012.

ROGERS, G. W. e. a. Assessment of fatty acid beta oxidation in cells and isolated mitochondria. **Current Protocols in Toxicology**, v.60, n.1, p.1-19, 2014.

RONGVAUX, A. Innate immunity and tolerance toward mitochondria. **Mitochondrion**, v.41, n.1, p.14-20, 2018.

ROSENBERG, H. F. e. a. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v.13, n.1, p.9-22, 2013.

ROY, S. e. a. Mitochondrial structural changes in the pathogenesis of diabetic retinopathy. **Journal of Clinical Medicine**, v.8, n.9, p.1-10, 2019.

SAGAN, L. On the origin of mitosing cells. **Journal of Theoretical Biology**, v.14, n.3, p.225-274, 1967.

SANTOS-ALVES, E. e. a. Exercise modulates liver cellular and mitochondrial proteins related to quality control signaling. **Life Sciences**, v.135, n.1, p.124-130, 2015.

SCHERZ-SHOVAL, R.; ELAZAR, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. **Trends in Cell Biology**, v.17, n.9, p.422-427, 2007.

SHAH, K. e. a. The emerging roles of eosinophils in mucosal homeostasis. **Mucosal Immunology**, v.13, n.1, p.574-583, 2020.

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

SHI, H. Z. e. a. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. **The Journal of Clinical Investigation**, v.105, n.7, p.945-953, 2000.

SIMON, H. U. e. a. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v.5, n.5, p.415-418, 2000.

SIMON, H. U. e. a. Refining the definition of hypereosinophilic syndrome. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.126, n.1, p.45-49, 2010.

SPENCER, L. A. e. a. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. **Frontiers in Immunology**, v.5, n.1, p.1-9, 2014.

STENFELDT, A. L.; WENNERÅS, C. Danger signals derived from stressed and necrotic epithelial cells activate human eosinophils. **Immunology**, v.112, n.4, p.605-614, 2004.

STURMEY, R. G. e. a. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: lipid association in the porcine oocyte. **Reproduction**, v.132, n.6, p.829-837, 2006.

SUGIURA, A. e. a. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. **The EMBO Journal**, v.33, n.19, p.2142-2156, 2014.

VAN DER BLIEK, A. M. e. a. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.5, n.6, p.1-17, 2013.

VERMA, A. e. a. Calcium ionophore A23187 reveals calcium related cellular stress as "I-Bodies": An old actor in a new role. **Cell Calcium**, v.50, n.6, p.510-522, 2011.

WANG, W. e. a. Therapeutic targets during mitochondrial lipid metabolism. Springer. v.36,n.1p.205-208, 2020.

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

WEN, T.; ROTHENBERG, M. E. The regulatory function of eosinophils. **Microbiology Spectrum**, v.4, n.5, p.257-269, 2017.

WEST, A. P. e. a. Mitochondria in innate immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v.11, n.6, p.389-402, 2011.