

CITOQUINAS DE TIPO 2 PROMUEVEN LA SECRECIÓN DE CCL26 POR LAS CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES EN PACIENTES SENSIBILIZADOS POR ALIMENTOS

Type-2 cytokines promote the secretion of CCL26 by intestinal epithelial cells in food-sensitized patients

Julián Vaccaro¹, Karina E. Canziani¹, Luciana Guzmán², Viviana Bernedo², Marcela García³, Eugenia M. Altamirano⁴, Emanuel Feregotti¹, Renata Curciarello¹, Cecilia I. Muglia¹, Guillermo H. Docena¹

RESUMEN

Diversos procesos inflamatorios intestinales se caracterizan por la acumulación de eosinófilos y se desconocen los mecanismos que median la inducción de este infiltrado celular. En este trabajo estudiamos las células epiteliales de pólipos colorrectales de niños con sangrado rectal y sensibilización alérgica, y el rol de citoquinas tipo 2 en la producción de la quimiocina CCL26. Analizamos 50 pólipos colorrectales de pacientes pediátricos con sangrado rectal y evaluamos la presencia de eosinófilos (tinción H&E o eosina), citoquinas proinflamatorias, IgE y CCL26 por microscopía óptica y ELISA; además se analizaron vías de señalización intracelular por *immunoblotting*. Encontramos en el estroma de los pólipos un infiltrado celular con predominio de eosinófilos respecto al control de tejido adyacente normal. Nuestros hallazgos muestran un incremento significativo en la producción de IL-4, IL-5 e IL-13. En cortes histológicos se detectó CCL26 en el compartimento epitelial mientras que en el estroma del pólipo se detectaron abundantes células IgE+. Demostramos que IL-13 induce la fosforilación de STAT-3 y STAT-6 y la secreción de CCL26 en células epiteliales intestinales, mientras que el bloqueo del receptor específico de IL-13 o la inhibición de vías de señalización, disminuyeron la secreción de CCL26 a niveles basales.

En conclusión, nuestros hallazgos indican que los pólipos colorrectales de pacientes pediátricos con sangrado rectal y sensibilización alérgica presentan eosinofilia y niveles elevados de CCL26 producidos por células epiteliales a través de la activación de la vía STAT3/STAT6/JAK1-2, inducida principalmente por IL-13.

Palabras clave: pólipos colorrectales, células epiteliales intestinales, IL-13, CCL26, STAT/JAK

ABSTRACT

The accumulation of eosinophils characterizes several bowel inflammatory processes, and the mechanisms that govern mucosal infiltration are not fully understood. In this work, we studied intestinal epithelial cells from colorectal polyps of children with rectal bleeding and allergic sensitization and the role of type-2 cytokines in the secretion of the CCL26 chemokine.

We analyzed colorectal polyps (n=50) from pediatric patients with rectal bleeding by H&E and eosin staining, different pro-inflammatory cytokines, IgE and CCL26 by ELISA and confocal microscopy, and intracellular activation pathways by immunoblotting.

We found a dense cell agglomeration within the polyps, with a significantly higher frequency of eosinophils than in control adjacent tissue. IL-4, IL-5 and IL-13 were significantly up-regulated in polyps and CCL26 was elevated in the epithelial compartment, whereas IgE+ cells were revealed only in the stroma of polyps. Experiments with Caco-2 cells showed that the type-2 cytokine IL-13 increased STAT3 and STAT6 phosphorylation and eotaxin-3 secretion. The addition of the blocking antibody Dupilumab or the inhibitor Ruxolitinib to the cytokine-stimulated Caco-2 cells diminished the CCL26 secretion to basal levels in a dose-dependent manner.

In conclusion, our findings demonstrate a high frequency of eosinophils and elevated levels of type-2 cytokines and eotaxin-3 in the inflammatory tissue of colorectal polyps from pediatric patients. Polyp epithelial cells showed to be the cell source of CCL26, and IL-13 was the main trigger of this chemokine through activating the STAT3/STAT6/JAK1-2 pathways.

Keywords: colorectal polyps, intestinal epithelial cells, IL-13, CCL26, STAT/JAK

Archivos de Alergia e Inmunología Clínica 2022;53(4):133-144

INTRODUCCIÓN

La inmunidad innata es una rama de la respuesta inmune altamente conservada en plantas, invertebrados y mamí-

feros cuyo conocimiento ha evolucionado marcadamente con la descripción en las últimas décadas de nuevas células y subpoblaciones celulares, circuitos de activación y regulación, y su impacto en la inducción de los mecanismos

1. Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP), UNLP, CONICET, Asociado a CIC PBA, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas, La Plata, Argentina.
2. Servicio de Gastroenterología, Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata, Argentina.
3. Sala de Alergia, Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata, Argentina.
4. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata, Argentina.

EF es estudiante de la Carrera de Bioquímica de la Universidad Nacional de La Plata; JV es bioquímico y becario de CONICET; LG, VB, MG y EMA son médicas del Hospital de Niños de La Plata; KEC, RC, CIM y GHD son Ph.D.

Correspondencia: Guillermo Docena. Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP), UNLP, CONICET, Asociado a CIC PBA, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas, Boulevard 62 número 1489, 1900 La Plata, Argentina. guidoc@biol.unlp.edu.ar. Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Fuentes de financiación: Proyectos 11/846 (Universidad Nacional de La Plata), PICT 2020 3199 y PICT 20182479 (Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Nación).

Recibido: 28/11/2022 | Aceptado: 13/12/2022

de la inmunidad adaptativa. Esto ha generado nuevos paradigmas que transformaron nuestra visión sobre el funcionamiento del sistema inmune. La inmunidad innata y adaptativa han sido estudiadas tradicionalmente como mecanismos independientes entre sí, pero existe actualmente suficiente evidencia para considerarlas mutuamente interactuantes y en muchos aspectos superpuestas.

Entre las células de la inmunidad innata, se encuentra un tipo de granulocitos denominados eosinófilos que son células en un estadio efector final que contribuyen con funciones esenciales tanto en homeostasis como en patología a través de la secreción de numerosas sustancias biológicamente activas. Entre los procesos biológicos más ampliamente estudiados se encuentran como principal función homeostática la defensa frente a infecciones helmínticas¹, mientras que, entre las últimas, su activación desregulada en las mucosas puede ocasionar patologías inflamatorias alérgicas². Sin embargo, recientemente se han descrito otras funciones homeostáticas en diferentes tejidos (desarrollo de órganos, regeneración tisular, etc)^{3,4}, por lo cual comprender los mecanismos de migración desde sangre periférica constituye un desafío. Estas células multifacéticas se encuentran distribuidas heterogéneamente en el tracto gastrointestinal, principalmente en el estroma o lámina propia, aunque también, y con menor frecuencia, en el compartimento epitelial. Son fuente de citoquinas, quimiocinas, mediadores lipídicos y factores de crecimiento por lo cual ejercen diversas funciones en la fisiología de las mucosas⁵. Sin embargo, la eosinofilia tanto en circulación periférica como en los tejidos mucosales constituye un marcador de un proceso infeccioso o de una inflamación alérgica.

A pesar de que mucho se conoce sobre los mecanismos de activación celular, su corta vida media, vías de secreción de sustancias biológicamente activas y de reclutamiento desde la médula ósea a los tejidos, su acumulación en los tejidos es todavía materia de debate y estudio. Estas células expresan en su superficie principalmente CCR3 o receptor de eotaxinas que las guían hacia los tejidos donde se producen las quimiocinas atrayentes. Entre las eotaxinas (eotaxina-1, -2 y -3), se encuentra la eotaxina-3 o CCL26, que es el quimioattractante de eosinófilos más potente descrito. Entre las fuentes celulares descritas para estas quimiocinas, se encuentran distintas células como fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales y células epiteliales^{6,7}. En cuanto a la distribución tisular de los eosinófilos, estos se acumulan en tejidos inmunes y no inmunes, siendo el tracto gastrointestinal el que aloja la mayor cantidad de células (5-25% de los leucocitos)⁸, mientras que en otros tejidos el porcentaje es menor al 4%^{9,10}. Dado que diferentes citoquinas y quimiocinas son críticas en su reclutamiento desde la médula ósea, en este trabajo estudiamos el rol

de citoquinas tipo 2 que previamente hemos descrito como dominantes en pólipos colorrectales de pacientes pediátricos con sangrado rectal y sospecha de alergia alimentaria¹¹. En ese trabajo describimos al estroma del pólipo como un órgano linfoide terciario donde el entorno inflamatorio predispone a la síntesis local de IgE y a un infiltrado celular denso que lo diferencia del tejido colónico circundante.

En el presente estudio investigamos el rol de la célula epitelial colónica en la secreción de CCL26 y en la activación celular mediada por citoquinas tipo 2, para promover la expresión y secreción de esta quimiocina en un contexto tisular inflamatorio alérgico.

MÉTODOS

PACIENTES Y MUESTRAS ANALIZADAS

En este trabajo se estudiaron 50 pólipos colorrectales de pacientes que fueron asistidos en la Sala de Gastroenterología y en el Servicio de Alergia del Hospital de Niños Sor María Ludovica de la Plata (Buenos Aires, Argentina), cuyas edades oscilaban entre 3 y 8 años (media: 5,5 años), 65,4% eran de sexo masculino y presentaban sangrado rectal. Por colonoscopia se detectó la presencia de pólipos colorrectales que fueron removidos por precaución y se analizaron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Niños y en el IIFP. Fueron hallados 39 pólipos en recto y 11 en colon sigmoideo; todos fueron pólipos únicos, pedunculados y con diferente tamaño. Además del tejido de los pólipos (P) se analizaron muestras de biopsias de tejido circundante (TCC) que se obtuvieron como muestra control de cada paciente. Asimismo, se estudiaron como controles muestras de colon sano de pacientes pediátricos sin patología inflamatoria (TCS) (n=10), pólipos tumorales (PT) adenomatosos de pacientes adultos (PA) (n=10) y pólipos colónicos hiperplásicos de pacientes adultos (PH) (n=10).

Los pacientes pediátricos fueron también estudiados en el Servicio de Alergia aplicándose criterios clínicos definidos para indagar sensibilización o alergia alimentaria, y se indicaron test complementarios (pruebas cutánea o *prick test* y serología para IgE)¹¹. La historia clínica incluyó antecedentes familiares y/o personales de dermatitis, rinitis, asma, alergia a drogas, etc. En la **Tabla 1** se incluyen datos de los 50 pacientes en los que se hallaron pólipos colorrectales, encontrándose que en el 90% de los mismos los valores séricos de IgE total fue superior a los valores control, mientras en el 92,3% de los sueros se detectaron niveles elevados de IgE específica para alérgenos alimentarios (leche de vaca, soja o maní). Un único paciente mostró prueba cutánea positiva, mientras que el 60% tenía antecedentes personales o familiares de atopía (dermatitis, urticaria y/o asma).

TABLA I. Datos de pacientes juveniles con sangrado rectal y pólipos.

Características	Pacientes (n=50)
Edad (a), mediana (IQR)	5,50 (3,70-8,0)
Total IgE (IU/ml), mediana (IQR)	212,10 (67,65-444,53)
Total IgE > 60 IU/ml, n (%)	45 (90)
IgE específica para leche de vaca, n (%)	40 (80)
IgE específica para maní, n (%)	44 (88)
IgE específica para soja, n (%)	37 (74)
Prueba cutánea o prick test, n (%)	1 (2)
IgE específica para alérgenos alimentarios, n (%)	42 (92,3)
Atópicos (antecedentes personales y familiares), n (%)	30 (60)
Dermatitis	8 (16)
Urticaria en respuesta a leche de vaca	4 (8)
Asma	4 (8)

IQR: intervalo intercuartílico.

El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Niños de La Plata (Buenos Aires, Argentina) (protocolos 389-2014 y 389-2018), y los pacientes o sus padres dieron el consentimiento firmado para ser parte del estudio.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Los tejidos provenientes de los pólipos y de las biopsias se caracterizaron histológicamente mediante tinción con hematoxilina y eosina (H&E) o eosina, o con anticuerpos específicos conjugados con fluorocromos, y luego se analizaron mediante microscopía óptica y confocal, respectivamente. Brevemente, los tejidos se fijaron durante por 12 hs a 4°C en paraformaldehído al 3% y luego se incluyeron en parafina siguiendo los protocolos habituales (Mercer et al., 2009). Se obtuvieron cortes del tejido intestinal de 5 µm, que se desparafinaron y se tiñeron con H&E (Biopur, Santa Fe, Argentina) o se trataron con citrato de sodio pH 6,0 a 95°C durante 15 min para la recuperación antigénica. Luego del bloqueo con albúmina de suero bovino al 2%, se incubó por un lado con anti-IgE humana hecho en cabra y conjugadoa FITC (diluida 1:25) (Southern Biotech, Birmingham, AL, EE.UU.) y por otro con anti-CCL26 humana hecho en cabra (diluida 1:20) (R&D Systems, Minnesota, EE.UU.) seguido de anti-IgG de cabra hecho en burro Alexa Fluor® 488 (diluido 1:300) (Abcam, San Francisco, EE.UU.) como anticuerpo secundario. Se empleó yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) para tinción de núcleos. Las fluorescencias se analizaron empleando un microscopio confocal SP5 Leica y las imágenes se analizaron con el software LAS AF Lite (Leica).

La tinción diferencial de eosinófilos se realizó en secciones de 5 µm de tejido de colon fijadas en formalina e incluidas en parafina y se tiñeron con la técnica de Papanicolaou siguiendo los protocolos del fabricante (Biopak, Buenos Aires, Argentina). Brevemente, las secciones de tejido intestinal se desparafinaron y posteriormente se tiñeron con hematoxilina, Orange G y eosina. A continuación, las sec-

ciones se deshidrataron y montaron con bálsamo canadiense. Para el recuento de eosinófilos se obtuvieron imágenes en un microscopio Leica DM500 con una cámara ICC50HD. Los recuentos de células se realizaron en campo de alta potencia (HPF), que representa un aumento de 400X y corresponde a un área de 0,1 mm² (número de campo de 18 mm). La presencia y frecuencia de eosinófilos se calculó según el recuento de células con un núcleo bilobulado junto con la tinción de sus gránulos conteniendo eosina.

CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CITQUINAS E IGE EN EL TEJIDO COLÓNICO

Las proteínas se extrajeron de muestras conservadas a -80°C de pólipos y de biopsias colónicas adyacentes al pólipo mediante homogeneización inmediata, empleando un rotor-estator en PBS con un cóctel de inhibidores de proteasas (SIGMA-Aldrich, MO, EE.UU.). Las citoquinas se cuantificaron en el lisado utilizando kits ELISA comerciales de acuerdo con las instrucciones del fabricante: IL-4 (Immunotools, Friesoythe, Alemania), IL-5 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.), IL-13 (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) e IFN-γ (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). Para estandarizar los valores obtenidos se pesó cada muestra y se refirió la cantidad de cada citoquina por gramo de tejido.

La IgE tisular específica de leche de vaca e IgE total se evaluaron mediante ELISA¹³, para lo cual se sensibilizaron fosas de microtitulación de poliestireno (NUNC, Maxisorp, Dinamarca) con antisuero policlonal anti-IgE humana (100 µl, 400 µg/ml) (Sigma, MO, EE.UU.) para la cuantificación de IgE total o alérgenos (proteínas de leche de vaca, soja o maní, 10 µg/ml) para la detección de IgE específica. Las fosas se bloquearon con suero equino al 5% en buffer fosfato salino pH 7.4. Se añadieron los lisados de los tejidos y se incubaron durante 1 hora a 37°C, seguido de incubación con el anticuerpo anti-IgE humano obtenido en cabra (específico de la cadena ε) y biotinilado (Vector Laboratories) (diluido 1:2000, 1 hora a

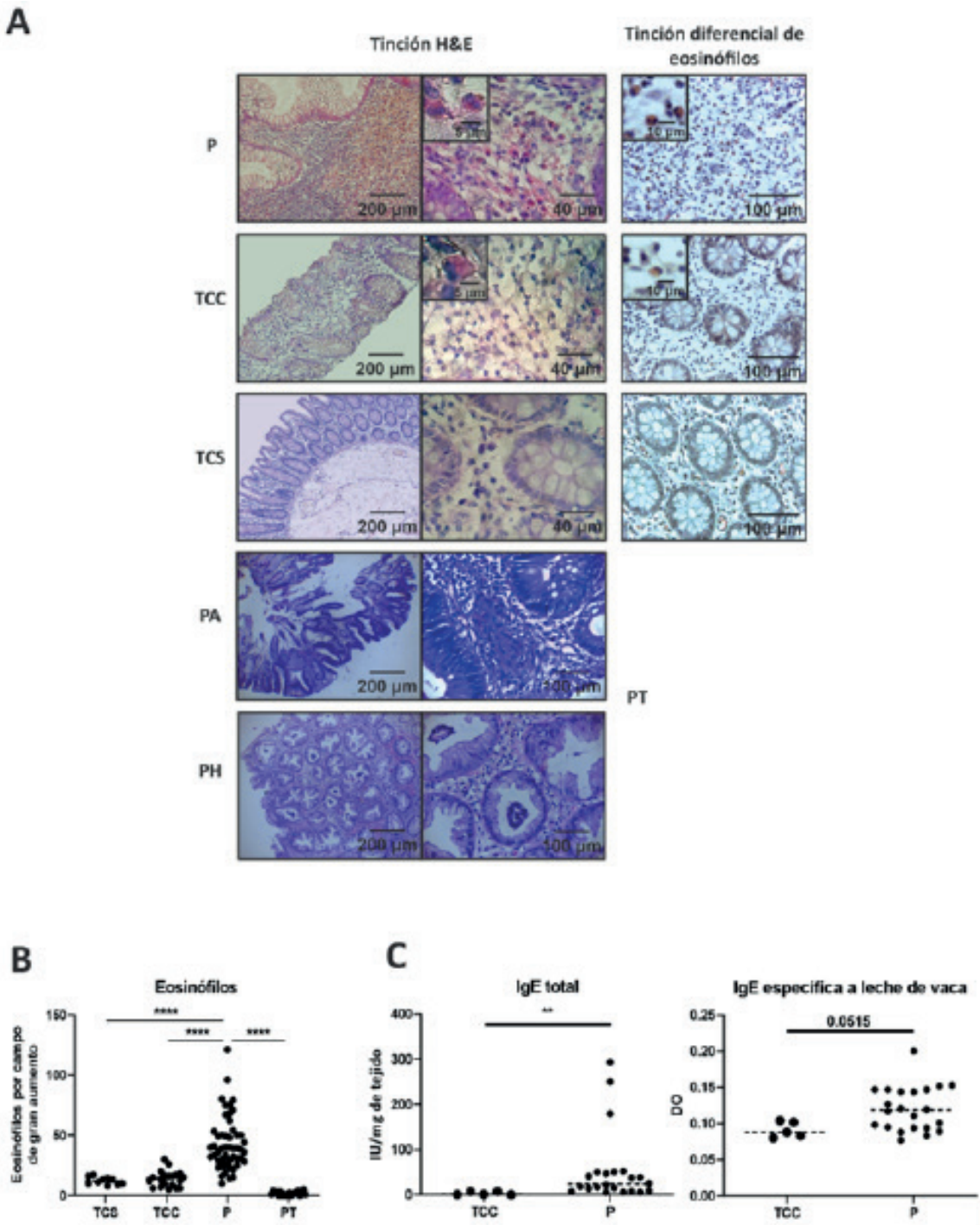


Figura 1. Infiltrado celular y frecuencia de eosinófilos en el estroma de pólipos colorrectales. (A) Histología (tinción H&E y tinción de eosina para eosinófilos) en cortes de pólipos (P), tejido control circundante (TCC), tejido control sano (HCT), pólipos hiperplásicos (PH) y adenomatosos (PA). Se muestran imágenes representativas. (B) Recuento de eosinófilos por microscopía óptica en pólipos colorrectales, pólipos tumorales (PT) y biopsias de tejido circundante. Los valores son expresados en valor medio \pm error estándar de la media (SEM) y las diferencias estadísticas fueron calculadas con el test de la t de Student (**** $p < 0,0001$).

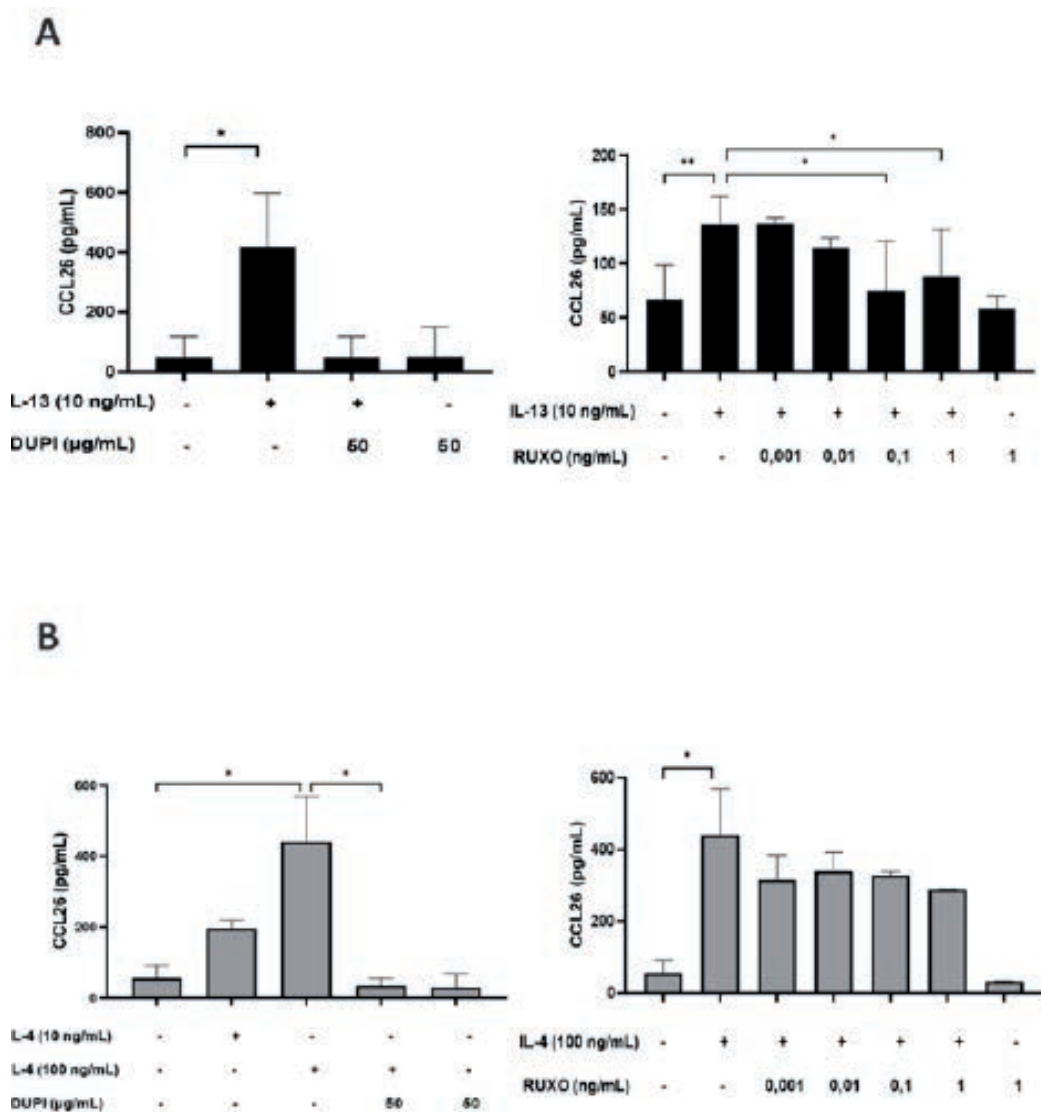


Figura 2. Análisis de IgE y CCL26. (A) IgE total e IgE específica para leche de vaca determinadas por ELISA indirecto en tejido total. (B) Detección de IgE y CD138 por microscopía en pólipos colorrectales y biopsias de tejido circundante. Las flechas indican células con co-localización de marcadores (células plasmáticas). Se muestran imágenes representativas. (C) Expresión de CCL26 por microscopía confocal, destacándose el compartimento epitelial con tinción citosólica de CCL26 (imagen con aumento). Se muestran imágenes representativas. Los valores son expresados en valor medio \pm SEM y las diferencias estadísticas fueron calculadas con el test de la t de Student (** $p < 0,01$).

37°C) seguido de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma, MO, EE.UU.) (diluido 1:10000, 1 hora a 37°C) para la cuantificación de IgE total; o mediante el empleo de anti-IgE humana conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma, MO, EE.UU.) (diluido 1:1000, 2 horas a 37°C) para la detección de IgE específica. Para la cuantificación de IgE total se construyó una curva de calibración por duplicado utilizando un estándar de referencia (1000 UI/ml) para IgE total. Como sustrato se utilizó orto-fenilendiamina (MP Biomedicals, CA, EE.UU.) y peróxido para IgE total, se detuvo la reacción con H_2SO_4 2M y se

midió la densidad óptica (DO) a 492 nm. Para la IgE específica se utilizó p-nitrofenil fosfato (Sigma, MO, EE.UU.), se detuvo la reacción con EDTA 0,1 N y se midió la DO a 405 nm. Se empleó para la lectura de DO un lector de placas Varioskan Lux (Thermo Scientific).

ENSAYO DE ELISA PARA CCL26

Para la cuantificación de la quimiocina CCL26 se empleó un ELISA comercial y se evaluó el sobrenadante de cultivo de células Caco-2 previamente estimuladas, como así también en lisados celulares de tejido colónico, siguiendo

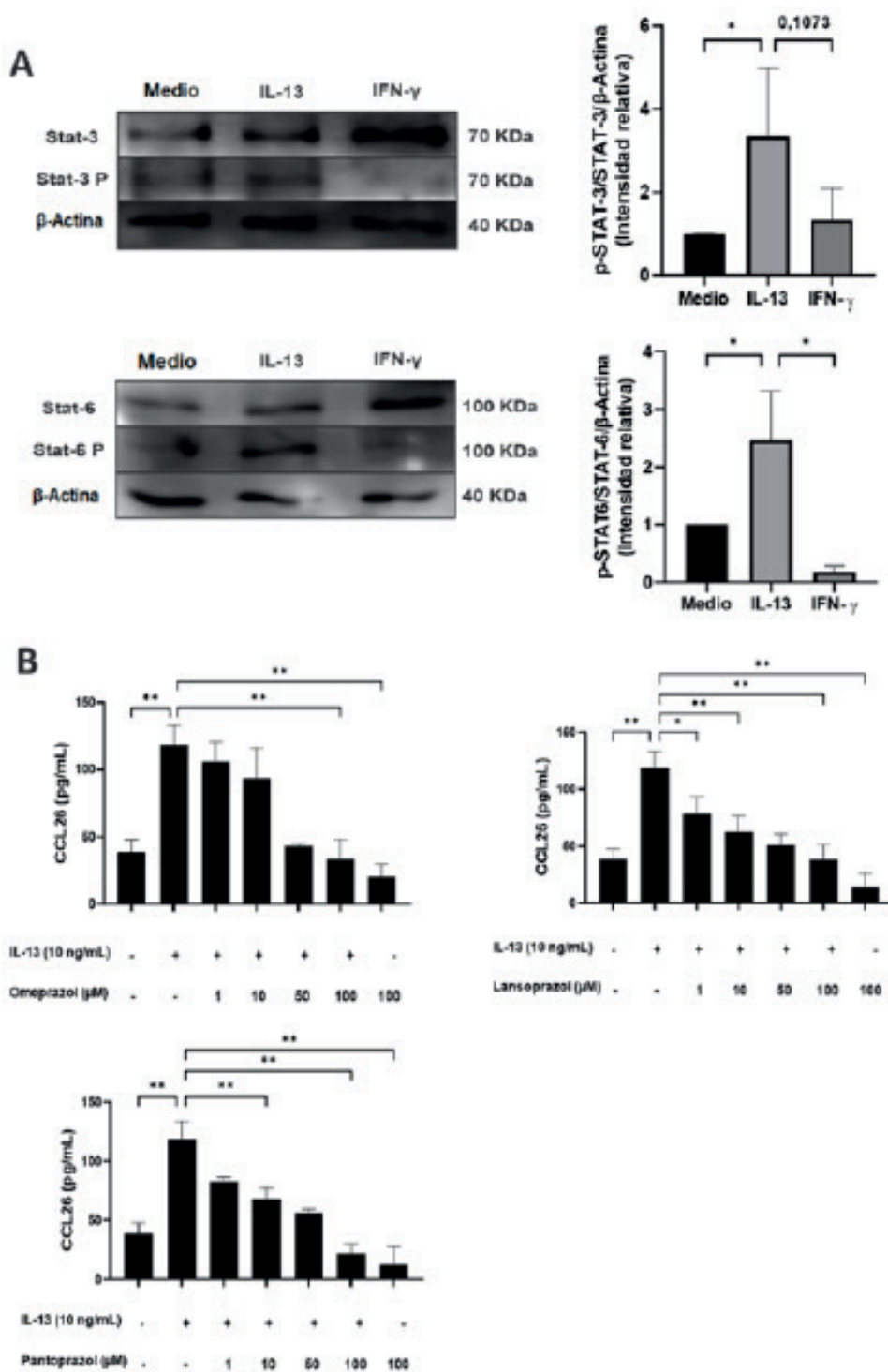


Figura 3. Análisis de citoquinas y secreción de CCL26. (A) Concentración de citoquinas por ELISA de captura en pólipos y biopsias. (B) Secreción de CCL26 por ELISA de captura en sobrenadante de cultivo de células epiteliales colónicas humanas Caco-2 estimuladas con distintas concentraciones de IL-13 e IL-4 (C) y co-cultivo con dupilumab (anticuerpo monoclonal específico de la cadena α común a los receptores de IL-4 e IL-13) (DUPI), y ruxolitinib, inhibidor de JAK 1 y 2 (RUXO). Los valores son expresados en valor medio \pm SEM y las diferencias estadísticas fueron calculadas con el test de la t de Student (* $p < 0,1$ y ** $p < 0,01$).

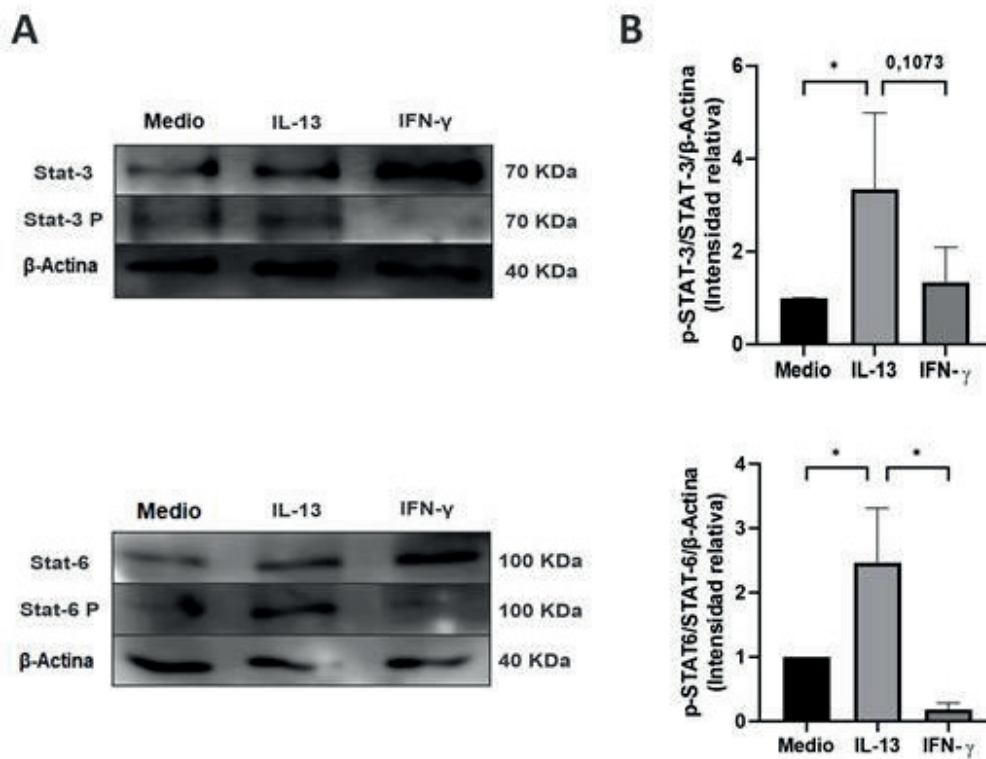


Figura 4. Análisis de la activación de las vías intracelulares de STAT3 y STAT6. (A) *Immunoblotting* para STAT3, STAT3 fosforilado, STAT6 y STAT6 fosforilado en lisado de Caco-2 estimuladas con IL-13 (10 ng/ml) o IFN γ (10 ng/ml) por 90min. (B) Análisis semicuantitativo de la intensidad de las bandas del *immunoblotting* mostrado como pSTAT-3/STAT-3/ β -actina y pSTAT-6/STAT-6/ β -actina representativos de la activación de cada vía intracelular. Los valores en cada columna representan valor medio \pm SEM y las diferencias estadísticas fueron calculadas con el test de la t de Student (* $p < 0,1$).

las instrucciones del fabricante (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). La cuantificación final se realizó empleando la curva de calibración del kit comercial y se midió DO a 405 nm empleando el lector de ELISA mencionado.

CULTIVO DE CÉLULAS Y EMPLEO DE ESTIMULADORES E INHIBIDORES CELULARES

Células Caco-2 se cultivaron en DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml y piruvato 110 mg/l. Las células confluentes cultivadas en placas de 24 pocillos se mantuvieron sin SFB durante 12 horas y luego se estimularon con IFN- γ humano recombinante (rh-IFN- γ) (10 ng/ml) o rh-IL-13 (10 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) durante 90 min. Se analizó la concentración de CCL26 en el sobrenadante de cultivo (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) como se describió anteriormente.

En paralelo se incubaron las células en presencia de los estímulos y dupilumab (anticuerpo monoclonal an-

ti-receptor alfa de interleuquina-4 humano) (50 μ g/ml) (Sanofi Genzyme, Regeneron, NY, EE.UU.) durante 48 horas a 37°C o de un inhibidor específico de JAK1 y JAK2, ruxolitinib, a distintas concentraciones (0,001, 0,01, 0,1, 1 ng/ml) (Novartis, Stein, Suiza) durante 2 horas a 37°C. Además, empleamos diferentes inhibidores de bomba de protones (IBP), omeprazol (Biotenk, Buenos Aires, Argentina), lansoprazol (Roemmers, Buenos Aires, Argentina) y pantoprazol (Baliarda S.A., Buenos Aires, Argentina) a diferentes concentraciones (1, 10, 50, 100 μ M) durante 2 horas a 37°C. Luego se cuantificaron los niveles de CCL26 como se indicó anteriormente.

ENSAYOS DE INMUNOTRASFERENCIA Y ESTUDIO DE LAS VÍAS INTRACELULARES DE ACTIVACIÓN

Las células Caco-2 fueron lisadas y recolectadas con 10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl y 0.1% Igepal en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y vanadato de sodio (VO₄Na) como inhibidor de fosfatasa. Se empleó el ensayo del ácido bicin-

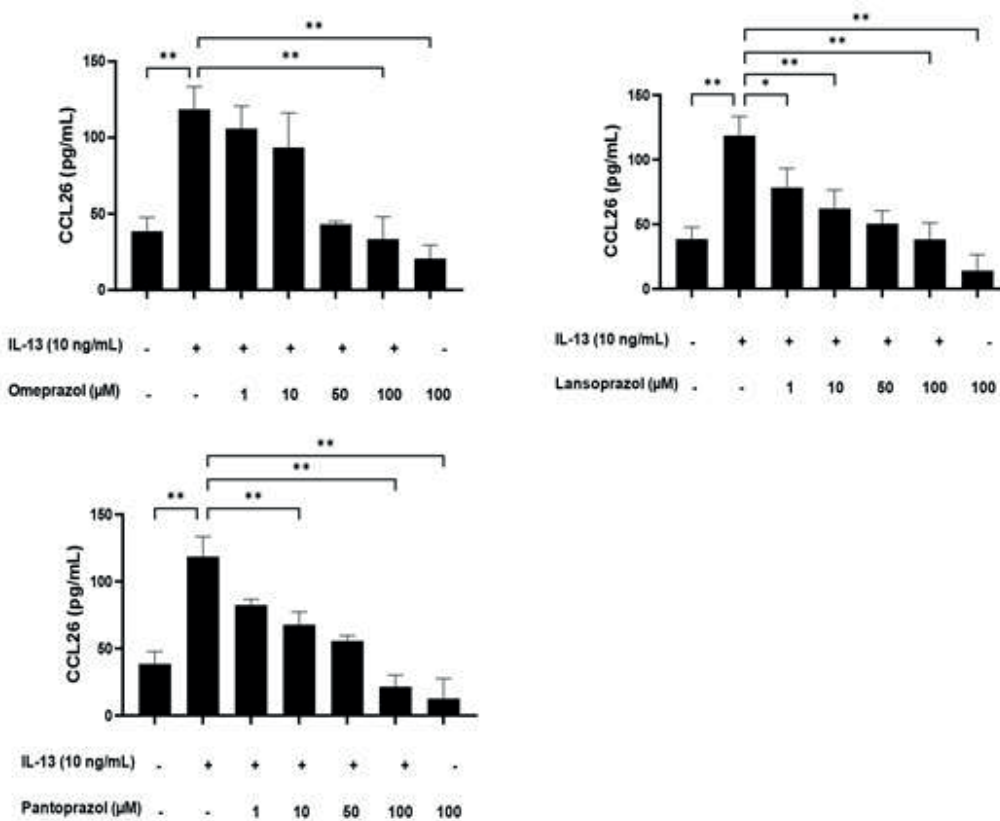


Figura 5. Análisis de la producción de CCL26 en Caco-2. Células Caco-2 fueron estimuladas con IL-13 y expuestas a diferentes inhibidores de la bomba de protones en distintas concentraciones (1-100 μ M). Los resultados están expresados en valor medio \pm SEM y las diferencias estadísticas fueron calculadas con el test de la t de Student (* $p < 0,1$ y ** $p < 0,01$).

conínico (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) para determinar la cantidad total de proteína de cada lisado celular. Los extractos de proteínas de las células Caco-2 se resolvieron en geles SDS-PAGE al 10 % en condiciones reductoras (Bio-Rad Mini Protean III; Bio-Rad, Richmond, CA, EE.UU.) y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempsted, Reino Unido) durante 1 hora a 300 mA. Las membranas transferidas se bloquearon (suero equino/TBS) y se incubaron con anticuerpos anti-STAT6 o anti-fosfo STAT6 hechos en ratón, diluidos 1:600 y 1:2000, respectivamente (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EE.UU.) o con anticuerpos anti-STAT3 o anti-fosfo-STAT3 hechos en ratón diluidos 1:600 y 1:300, respectivamente (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EE.UU.) como anticuerpos primarios; luego se empleó un anticuerpo IgG antirratón obtenido en cabra conjugado con HRP diluida 1:3000 como anticuerpo secundario (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Se empleó β -actina como control de carga interno empleando un anticuerpo primario anti- β -actina obtenido en conejo, diluido 1:2000 (Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.) seguido de un anticuerpo IgG anticonejo obtenido en cabra conjugado con HRP diluida 1:3000 como anticuerpo secundario

(Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Las bandas de proteínas se visualizaron mediante reactivos de quimioluminiscencia mejorados (ECL Plus; GE Healthcare, Danderyd, Suecia) y se escanearon con un escáner C digit (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, EE.UU.). La intensidad de cada banda se cuantificó empleando el software ImageJ.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación entre grupos pareados se realizó mediante la prueba t de Student. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre medias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,1$. Se utilizó GraphPad Prism 8.00 (San Diego, CA, EE. UU.) para el análisis estadístico.

RESULTADOS

ANÁLISIS DEL INFILTRADO CELULAR DE LOS PÓLIPOS COLORRECTALES

Estudios previos de nuestro grupo reportaron que un 47,9% de pacientes con sangrado rectal y sospecha de alergia alimentaria presentan pólipos colorrectales, pedunculados, en su gran mayoría únicos, con diferentes tamaños

y confinados a la porción del recto¹¹. Aquí analizamos 50 pólipos de este tipo y evidenciamos que el estroma presenta un infiltrado celular a diferencia del tejido analizado en biopsias obtenidas de zonas circundantes. En la **Figura 1A** se muestran imágenes representativas de estos infiltrados celulares y puede observarse que la celularidad de los pólipos está marcadamente incrementada en comparación al tejido circundante control o muestras colónicas de individuos sin patología inflamatoria. En este infiltrado celular se observa una elevada frecuencia de células mononucleares, mastocitos y eosinófilos (se muestran en forma magnificada en las fotos individuales). En la figura también se muestran como controles el análisis histológico de cortes obtenidos de pólipos adenomatosos (PA) e hiperplásicos (PH) obtenidos de pacientes adultos, dado que estos pólipos tumorales son infrecuentes en población pediátrica. En ninguno de estos casos se observa un infiltrado celular inflamatorio con presencia de eosinófilos.

La tinción de eosinófilos nos permitió realizar el recuento de los mismos y, como se muestra en la **Figura 1B**, encontramos un aumento significativo de la frecuencia de eosinófilos en los pólipos colorrectales en comparación con los controles analizados (TCC, TCS y PT) (43,06±22,32 vs 13,75±6,67, 12,10±2,98 y 3,23±2,66 eosinófilos o/HPF, respectivamente).

Dado que el infiltrado celular de P muestra características de ser inflamatorio y alérgico, analizamos los niveles de IgE en los diferentes tejidos colónicos (**Figura 2A**). Nuestros resultados muestran un aumento de los niveles de IgE total en el estroma de los pólipos en comparación con las respectivas biopsias control de cada paciente (TCC) ($p < 0,01$). Asimismo, analizamos los niveles de IgE específica para diferentes alérgenos alimentarios y encontramos un aumento de los niveles de IgE específica para proteínas de leche de vaca en los pólipos en comparación con tejido circundante control ($p < 0,1$) (**Figura 2A**). Previamente demostramos una elevada frecuencia de células IgE⁺¹¹ en el estroma de los pólipos, con valores reducidos en el tejido circundante. Aquí, el análisis de la IgE total y específica sérica de los pacientes en los cuales se hallaron y removieron los pólipos mostró que el 90% de los mismos tienen IgE total elevada, mientras que el 6,8% tienen IgE específica para leche de vaca elevada (**Tabla 1**). Estos hallazgos se corresponden con los niveles elevados de IgE hallados en el tejido del pólipo.

En la **Figura 2B** se muestran células IgE⁺ en el estroma de los pólipos únicamente, algunas de las cuales corresponden a eosinófilos, por la forma bilobular de sus núcleos. Los tejidos controles analizados mostraron frecuencias reducidas de células IgE⁺. Asimismo, analizamos la presencia de CCL26 y en la figura 2C se muestra la presencia de esta quimiocina en las células del compartimento epitelial.

Las muestras de TCC correspondientes a las de P de cada paciente mostraron niveles reducidos de células IgE⁺ y ausencia de CCL26.

PRODUCCIÓN DE CCL26 POR CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES

Para estudiar las citoquinas predominantes en los tejidos, se cuantificaron por ELISA citoquinas tipo 1 (IFN- γ) y tipo-2 (IL-4, IL-5 e IL-13) en lisados de biopsias colónicas y de pólipos de cada paciente. Nuestros hallazgos muestran un aumento de las citoquinas tipo 2 en los pólipos en comparación con las respectivas muestras de biopsias de tejido circundante (**Figura 3A**). El mayor incremento se observa para IL-13 ($p < 0,005$) y es importante resaltar que la relación IL-13/IFN- γ se encuentra significativamente más elevada en los pólipos, lo cual indica el predominio de un microentorno inflamatorio tipo 2.

Posteriormente, analizamos la secreción de CCL26 en la línea epitelial colónica humana Caco-2, ampliamente utilizada y validada para este tipo de estudios. El análisis de CCL26 o eotaxina-3 se fundamenta en que es una potente quimiocina para atraer eosinófilos a diferentes tejidos^{14,15}. En la **Figura 3B** se muestra el efecto de IL-13 sobre la secreción de CCL26. Puede observarse que esta citoquina tipo 2 promueve significativamente la producción y secreción de CCL26 en comparación con las células incubadas con medio de cultivo ($p < 0,5$). En la **Figura 3C** se muestran los resultados del estímulo de las células epiteliales con IL-4. Nuevamente observamos que la secreción de CCL26 es dosis-dependiente de esta citoquina y que el bloqueo del receptor de IL-13 o IL-4 mediante el empleo de dupilumab reduce marcadamente la producción y secreción de esta quimiocina. Asimismo, observamos que la producción de CCL26 inducida por IL-13 e IL-4 se suprime mediante el empleo de ruxolitinib, el cual inhibe a las kinasas intracelulares JAK1 y JAK 2.

Estos resultados indican que la vía STAT/JAK se encuentra implicada en la inducción de la expresión y secreción de CCL26 por citoquinas tipo 2. Para confirmar este hallazgo evaluamos la fosforilación de STAT3 y STAT6 por *immunoblotting* luego de incubar a las células epiteliales con IL-13, o IFN- γ como control (**Figura 4**). En la **Figura 4A** mostramos los resultados hallados en lisados celulares de Caco-2 incubadas con las citoquinas mencionadas. Observamos que sólo IL-13 indujo la fosforilación y consiguiente activación de STAT3, como puede observarse en el gráfico de la relación fosfo-STAT3/STAT3 ($p < 0,1$) (**Figura 4B**). En forma similar, encontramos que la vía de STAT6 se induce al incubar las células epiteliales con IL-13. En la **Figura 4B** se muestra la relación de la intensidad de las bandas de fosfo-STAT6 con respecto a la de la banda STAT6 ($p < 0,1$), en comparación con la condición control de células incubadas únicamente con medio de culti-

vo. Por lo tanto, IL-13 induce, a través de su receptor específico de membrana, la activación de las vías STAT3/JAK y STAT6/JAK y la consiguiente secreción de CCL26. Finalmente, evaluamos el efecto de los inhibidores de bombas de protones sobre la secreción de CCL26 promovida por IL-13. Como se observa en la **Figura 5**, omeprazol, lansoprazol y pantoprazol inhiben significativamente en forma dosis-dependiente la producción de eotaxina-3 por parte de células epiteliales colónicas humanas. También puede observarse que ninguna de las 3 drogas induce la secreción de CCL26 por sí solas.

DISCUSIÓN

Diferentes procesos inflamatorios que afectan el tracto gastrointestinal se caracterizan por un aumento en la frecuencia de los eosinófilos en el tejido afectado. Sin embargo, los mecanismos que gobiernan el reclutamiento de estas células no son del todo conocidos y probablemente difieran según se trate de una situación de homeostasis o patología. En este estudio, investigamos el rol que las células epiteliales tendrían como fuente de eotaxina-3 en la quimioatracción de eosinófilos en un entorno tisular dominado por citoquinas de tipo 2. Para ello estudiamos la producción y secreción de esta quimiocina en un tejido caracterizado por la presencia de alarminas y otras citoquinas que frecuentemente se encuentran elevadas en una inflamación alérgica¹⁶. En este trabajo demostramos que células Caco-2 estimuladas con IL-4 e IL-13 expresan y secretan eotaxina-3 a través de la activación de las vías intracelulares de señalización dependiente de STAT-3 y de STAT-6. Este proceso es específico de las citoquinas tipo 2 dado que con dupilumab, agente biológico bloquea a los receptores de membrana de IL-4 e IL-13, se inhibe su secreción. Por lo tanto, estos hallazgos indican que la célula epitelial colónica está implicada en la producción y secreción de eotaxina-3 que recluta activamente a los eosinófilos al tejido. También aquí mostramos que el estroma de pólipos colorrectales de pacientes con sensibilización alérgica a alérgenos alimentarios presenta un entorno dominado por citoquinas tipo-2, en especial IL-13, y que la secreción de CCL26 se da principalmente en el compartimento epitelial. Por el contrario, en tejido periférico no inflamado, donde IL-13 no se encuentra incrementada, los niveles de CCL26 son significativamente menores. En trabajos previos, demostramos que en el estroma de los pólipos se encuentran centros germinales activos en los cuales se sintetiza IgE a través de mecanismos de cambio de isotipo a ϵ ¹¹. La ausencia de niveles elevados de IgE en el tejido circundante al pólipo indica que la IgE se sintetiza en el mismo y que no proviene de sangre periférica. Por lo tanto,

el contexto inflamatorio del pólipo, probablemente inducido por las células epiteliales, es crítico en la promoción de la síntesis de IgE y el reclutamiento de eosinófilos al tejido mucosal.

En el tracto gastrointestinal, los eosinófilos son componentes celulares fisiológicos, tanto en intestino delgado como en colon. Se ha reportado que en homeostasis la frecuencia de estas células oscila en 9-26 eosinófilos/HPF en intestino delgado, mientras que en colon normal, el rango asciende a 20-50 eosinófilos/HPF, y principalmente se encuentran dispersos en la lámina propia aunque con localización cercana a las criptas^{17,18}. Esto probablemente implique una relación funcional entre las células epiteliales y los eosinófilos. En este estudio, hallamos que los eosinófilos se encuentran en un rango de 13-20 eosinófilos/HPF en colon normal (tejido circundante), mientras que, en los pólipos, la frecuencia se encuentra significativamente elevada (43,06+/-22,32 eosinófilos/HPF). Otros autores han reportado valores similares en pólipos nasales con un elevado recuento de eosinófilos y de quimiocinas asociadas al reclutamiento de estas células¹⁹. Del mismo modo, CCL26 ha sido descrita en situaciones similares en tejido pulmonar y en piel, siendo producida por células epiteliales bronquiales²⁰ y keratinocitos²¹ en un entorno inflamatorio alérgico en pacientes con asma y dermatitis²²⁻²⁴. Sin embargo, CCL26 no ha sido descrita en el contexto mucosal de pacientes con alergia alimentaria. La sobreexpresión de IL-13 ha sido también descrita como promotora de la disrupción de la integridad física de la barrera epitelial intestinal y la consiguiente inducción de un proceso inflamatorio que promueve el remodelamiento histológico²⁵⁻²⁸. En nuestro estudio, hallamos que distintas citoquinas tipo 2 están marcadamente incrementadas, pero IL-13 es la que se encuentra en mayores niveles. Esto generó la hipótesis de trabajo de nuestro estudio, que nos permitió demostrar que esta citoquina está fundamentalmente implicada en la secreción de CCL26 por parte de las células epiteliales. En este sentido, solo existe bibliografía que muestra resultados similares en líneas celulares. Blanchard y cols. reportaron que las líneas celulares colónicas humanas HT-29 CL.19A y T84 secretan eotaxina-3 al ser estimuladas por IL-4 o IL-13 en forma dosis-dependiente²⁹. Otros autores han reportado resultados en este sentido, en los cuales CCL26 se induce a través de la activación de la vía de STAT-6/JAK1. Aquí describimos que en células epiteliales colónicas humanas, las vías de activación celular dependientes de STAT-3 y STAT-6 asociadas a JAK1 y 2 se encuentran implicadas en el mecanismo de producción de eotaxina-3. Lan y cols. demostraron que biopsias de pacientes con cáncer colorrectal mostraron niveles elevados de CCL26 en estadios avanzados³⁰, proceso que se encuentra asociado a la evolución a malignidad. Asimismo, STAT-6 se ha demostrado que regula la expre-

sión de CCL26 en células esofágicas³¹ y en muestras de pacientes con esofagitis eosinofílica en las cuales existe un infiltrado inflamatorio alérgico³². Por el contrario, no hemos hallado correlación entre inflamación, eosinofilia y niveles tisulares de CCL5 o RANTES, a pesar que estas células expresan el receptor CCR1³³ y que RANTES se ha descrito como una quimiocina activa en la atracción de eosinófilos a los tejidos periféricos³⁴. Por lo tanto, nuestros hallazgos indican que hay mecanismos específicos de inducción de condiciones quimioatrativas de eosinófilos en un entorno inflamatorio alérgico, dependiente principalmente del eje IL-13-CCL26.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que el estroma de los pólipos colorrectales de pacientes con sensibilización alérgica contienen un denso infiltrado celular inflamatorio dominado por eosinófilos y citoquinas tipo 2. El compartimento epitelial de los pólipos, y no del tejido circundante normal, muestra niveles elevados de eotaxina-3 y citoquinas tipo 2. El empleo de la línea epitelial

colónica humana Caco-2 nos permitió alcanzar una mayor comprensión de los mecanismos que promueven la secreción de este potente quimioattractante de eosinófilos. Hemos generado evidencia experimental por la cual las citoquinas tipo 2, IL-4 e IL-13, principalmente esta última, induce a través de sus receptores específicos, la activación de las vías de STAT-3/JAK1 y STAT-6/JAK-1 para activar la transcripción de CCL26. En conjunto, estos resultados sugieren que la inflamación alérgica, probablemente inducida en pacientes atópicos expuestos a alérgenos alimentarios, las células epiteliales juegan un papel central en las etapas tempranas de inducción de un infiltrado alérgico y posterior atracción de eosinófilos periféricos al tejido mucosal.

AGRADECIMIENTOS

JV y KEC son becarios de CONICET; RC, CIM y GHD son Investigadores de CONICET.

BIBLIOGRAFIA

- Huang L, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Ruyechan MC, Lubert KL, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA. Eosinophils mediate protective immunity against secondary nematode infection. *J Immunol* 2015;194:283–290. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1402219.
- Akuthota P, Weller P. Eosinophils and disease pathogenesis. *Semin Hematol*. 2012; 49:113–119. doi: 10.1053/J.seminhematol.2012.01.005.
- Travers J, Rothenberg ME. Eosinophils in mucosal immune responses. *Mucosal Immunol*. 2015;8:464–475. doi: 10.1038/MI.2015.2.
- Shah K, Ignacio A, McCoy KD, Harris NL. The emerging roles of eosinophils in mucosal homeostasis. *Mucosal Immunol*. 2020;13:574–583. doi: 10.1038/S41385-020-0281-Y.
- Coakley G, Wang H, Harris NL. Intestinal eosinophils: multifaceted roles in tissue homeostasis and disease. *Semin Immunopathol*. 2021;43:307–317. doi: 10.1007/S00281-021-00851-2.
- Ahrens R, Waddell A, Seidu L, Blanchard C, Carey R, Forbes E, Lampinen M, Wilson T, Cohen E, Stringer K, et al. Intestinal macrophage/epithelial cell-derived CCL11/eotaxin-1 mediates eosinophil recruitment and function in pediatric ulcerative colitis. *J Immunol*. 2008;181:7390–7399. doi: 10.4049/JIMMUNOL.181.10.7390.
- Salcedo R, Young HA, Ponce ML, Ward JM, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. Eotaxin (CCL11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. *J Immunol*. 2001;166:7571–7578. doi: 10.4049/JIMMUNOL.166.12.7571.
- DeBrosse CW, Case JW, Putnam PE, Collins MH, Rothenberg ME. Quantity and distribution of eosinophils in the gastrointestinal tract of children. *Pediatr Dev Pathol*. 2006;9:210–218. doi: 10.2350/11-05-0130.1.
- Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, Xiao X, Birrell MA, Pirrottin D, Jans T, Starkl P, Ramery E, Henket M, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest*. 2016;126:3279–3295. doi: 10.1172/JCI85664.
- Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*. 2011;332:243–247. doi: 10.1126/SCIEN-CE.1201475.
- Canziani KE, Pucci Molineris M, Guzman L, Bernedo V, Garcia M, Altamirano EM, Muglia CI, Docena GH. Direct evidence for local IgE production in the human colonic mucosa. *Allergy*. 2021;76:1545–1549. doi: 10.1111/ALL.14594.
- Mercer N, Guzman L, Cueto Rua E, Drut R, Ahmed H, Vasta GR, Toscano MA, Rabinovich GA, Docena GH. Duodenal intraepithelial lymphocytes of children with cow milk allergy preferentially bind the glycan-binding protein galectin-3. *Int J ImmunopatholPharmacol*. 2009; 22:207–217. doi: 10.1177/039463200902200123.
- Docena G, Rozenfeld P, Fernández R, Fossati CA. Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy*. 2002;57:83–91. doi: 10.1034/J.1398-9995.2002.103219.X.
- Baumann R, Rabaszowski M, Stenin I, Tilgner L, Scheckenbach K, Wiltfang J, Schipper J, Chaker A, Wagenmann M. Comparison of the nasal release of IL-4, IL-10, IL-17, CCL13/MCP-4, and CCL26/eotaxin-3 in allergic rhinitis during season and after allergen challenge. *Am J Rhinol Allergy*. 2013;27:266–272. doi: 10.2500/AJRA.2013.27.3913.
- Provost V, Larose M-C, Langlois A, Rola-Pleszczynski M, Flaman N, Laviolette M. CCL26/eotaxin-3 is more effective to induce the migration of eosinophils of asthmatics than CCL11/eotaxin-1 and CCL24/eotaxin-2. *J Leukoc Biol*. 2013;94:213–222. doi: 10.1189/JLB.0212074.
- Chan R, Stewart K, Misirovs R, Lipworth BJ. Targeting Downstream Type 2 Cytokines or Upstream Epithelial Alarmins for Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2022;10:1497–1505. doi: 10.1016/J.JAIP.2022.01.040.
- DeBrosse CW, Case JW, Putnam PE, Collins MH, Rothenberg ME. Quantity and distribution of eosinophils in the gastrointestinal tract of children. *Pediatr Dev Pathol*. 2006;9:210–218. doi: 10.2350/11-05-0130.1.
- Shah K, Ignacio A, McCoy KD, Harris NL. The emerging roles of eosinophils in mucosal homeostasis. *Mucosal Immunol*. 2020;13:574–583. doi: 10.1038/s41385-020-0281-y.

19. Saito H, Honda K, Asaka C, Ueki S, Ishikawa K. Eosinophil chemotaxis assay in nasal polyps by using a novel optical device EZ-TAXIScan: Role of CC-chemokine receptor 3. *Allergol Int.* 2016;65:280–285. doi: 10.1016/J.ALIT.2016.01.001.
20. Komiya A, Nagase H, Yamada H, Sekiya T, Yamaguchi M, Sano Y, Hanai N, Furuya A, Ohta K, Matsushima K, et al. Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells. *Cell Immunol.* 2003;225:91–100. doi: 10.1016/j.cellimm.2003.10.001.
21. Kagami S, Saeki H, Komine M, Kakinuma T, Tsunemi Y, Nakamura K, Sasaki K, Asahina A, Tamaki K. Interleukin-4 and interleukin-13 enhance CCL26 production in a human keratinocyte cell line, HaCaT cells. *Clin Exp Immunol.* 2005;141:459–466. doi: 10.1111/J.1365-2249.2005.02875.X.
22. Kagami S, Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Nakamura K, Takekoshi T, Kishimoto M, Mitsui H, Torii H, et al. Significant elevation of serum levels of eotaxin-3/CCL26, but not of eotaxin-2/CCL24, in patients with atopic dermatitis: serum eotaxin-3/CCL26 levels reflect the disease activity of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 2003;134:309–313. doi: 10.1046/J.1365-2249.2003.02273.X.
23. Larose MC, Chakir J, Archambault AS, Joubert P, Provost V, Laviolette M, Flamand N. Correlation between CCL26 production by human bronchial epithelial cells and airway eosinophils: Involvement in patients with severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:904–913. doi: 10.1016/J.JACI.2015.02.039.
24. Guttman-Yassky E, Bissonnette R, Ungar B, Suárez-Fariñas M, Ardeleanu M, Esaki H, Suprun M, Estrada Y, Xu H, Peng X, et al. Dupilumab progressively improves systemic and cutaneous abnormalities in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143:155–172. doi: 10.1016/J.JACI.2018.08.022.
25. Purwar R, Werfel T, Wittmann M. IL-13-stimulated human keratinocytes preferentially attract CD4+CCR4+ T cells: possible role in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2006;126:1043–1051. doi: 10.1038/SJ.JID.5700085.
26. Bao K, Reinhardt RL. The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity. *Cytokine.* 2015;75:25–37. doi: 10.1016/J.CYTO.2015.05.008.
27. Tazawa T, Sugiura H, Sugiura Y, Uehara M. Relative importance of IL-4 and IL-13 in lesional skin of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 2004;295:459–464. doi: 10.1007/S00403-004-0455-6.
28. Koppes SA, Brans R, LjubojevicHadzavdic S, Frings-Dresen MHW, Rustemeyer T, Kezic S. Stratum Corneum Tape Stripping: Monitoring of Inflammatory Mediators in Atopic Dermatitis Patients Using Topical Therapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;170:187–193. doi: 10.1159/000448400.
29. Blanchard C, Durual S, Estienne M, Emami S, Vasseur S, Cuber JC. Eotaxin-3/CCL26 gene expression in intestinal epithelial cells is up-regulated by interleukin-4 and interleukin-13 via the signal transducer and activator of transcription 6. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:2559–2573. doi: 10.1016/J.BIOCEL.2005.06.010.
30. Lan Q, Lai W, Zeng Y, Liu L, Li S, Jin S, Zhang Y, Luo X, Xu H, Lin X, et al. CCL26 Participates in the PRL-3-Induced Promotion of Colorectal Cancer Invasion by Stimulating Tumor-Associated Macrophage Infiltration. *Mol Cancer Ther.* 2018;17:276–289. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0507.
31. Goswami R, Jabeen R, Yagi R, Pham D, Zhu J, Goenka S, Kaplan MH. STAT6-dependent regulation of Th9 development. *J Immunol.* 2012;188:968–975. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1102840.
32. Krishnamurthy P, Sherrill JD, Parashette K, Goenka S, Rothenberg ME, Gupta S, Kaplan MH. Correlation of increased PARP14 and CCL26 expression in biopsies from children with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:577–580.e2. doi: 10.1016/J.JACI.2013.09.031.
33. Phillips RM, Stubbs VEL, Henson MR, Williams TJ, Pease JE, Sabroe I. Variations in eosinophil chemokine responses: an investigation of CCR1 and CCR3 function, expression in atopy, and identification of a functional CCR1 promoter. *J Immunol.* 2003;170:6190–6201. doi: 10.4049/JIMMUNOL.170.12.6190.
34. Kuna P, Alam R, Ruta U, Gorski P. RANTES induces nasal mucosal inflammation rich in eosinophils, basophils, and lymphocytes in vivo. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:873–879. doi: 10.1164/AJRCCM.157.3.9610052.