

POLIMORFISMOS DE RECEPTORES SEMEJANTES A TOLL 2 Y 4 EN PACIENTES CON ASMA BRONQUIAL Y ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)

Nancy Elizabeth Larocca G¹, Juan Bautista De Sanctis², Félix Toro³, Dolores Moreno⁴, Carlos Tálamo⁵

RESUMEN: Los receptores semejantes a Toll forman parte del sistema inmune. Algunas mutaciones en estos receptores se han relacionado con el desarrollo de enfermedades como el asma bronquial y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Se realizó un estudio de casos-controles, en el que se incluyeron 100 pacientes con asma bronquial, 100 pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y 100 controles. A través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, se investigó la presencia de polimorfismos en TLR2 (Arg677Trp y Arg753Gln) y TLR4 (Asp299Gly y Thr399Ile) y su asociación con asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Se demostró la presencia de polimorfismos en TLR4 con una frecuencia del 9 % en cada grupo de estudio. No se observó relación alguna entre la presencia de polimorfismos en TLR4 y los índices de gravedad para asma bronquial o enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

La gravedad de los pacientes con asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica no está relacionada con los polimorfismos en TLR 4.

Palabras clave: Polimorfismos, TLR2, TLR4, Asma bronquial, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

ABSTRACT: Toll like receptors are important in the inflammatory immune response. Several mutations of these receptors have been related to the development and chronicity of different inflammatory diseases as bronchial asthma and obstructive pulmonary disease.

A case control study was performed, 100 patients with bronchial asthma, 100 obstructive pulmonary disease and 100 controls. Restriction based polymorphism PCR analysis was performed for TLR2 (Arg677Trp and Arg753Gln) and TLR4 (Asp299Gly and Thr399Ile) genes and its association with asthma and obstructive pulmonary disease was assessed.

The frequency of TLR4 polymorphism was 9 % in each group studied (asthma, obstructive pulmonary disease and controls). No association was found among TLR4 polymorphism and stage of disease for asthma or obstructive pulmonary disease.

TLR4 polymorphism are not associated with the presence or severity of asthma or obstructive pulmonary disease in the Venezuelan population.

Key words: Polymorphisms, TLR2, TLR4, Bronchial asthma, Obstructive pulmonary disease.

Instituto de Inmunología. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Universidad Central de Venezuela, Edificio del Instituto de Inmunología, Los Chaguaramos. Caracas, Venezuela. Código Postal: 1053. Fax: (0212)6932815/2734.

Dirección electrónica: <http://www.med.ucv.ve/idi>

Trabajo financiado por: Proyecto FONACIT # G2005000389.

¹MSc. en Inmunología Clínica. Instructor contratado. Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Recibido: 13-10-08

Aceptado: 30 -10-08.

² Doctor en Ciencias Fisiológicas, mención Bioquímica. Coordinación de Investigación y docencia. Instituto de Inmunología. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

³ Doctor en Biología Celular. Profesor agregado. Director del Posgrado de Inmunología Básica. Instituto de Inmunología. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

⁴ Especialista en Neumonología. Profesor Asistente. Jefe de la Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Escuela de Medicina "Luis Razetti". Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

⁵ Especialista en Neumonología. Jefe del Servicio de Neumonología. Hospital Universitario de Caracas. Caracas, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

El asma bronquial y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) son enfermedades de las vías aéreas caracterizadas por obstrucción del tracto respiratorio y por continuos procesos inflamatorios crónicos. Ambas patologías se consideran enfermedades complejas, multifactoriales, derivadas de la interacción de varios genes y de múltiples elementos ambientales⁽¹⁾.

La identificación de genes asociados al desarrollo de asma y EPOC se ha realizado a través del estudio de un gran número de polimorfismos genéticos con aparente rol central en la patogénesis de estas enfermedades⁽²⁾.

Los receptores semejantes a Toll (Toll Like Receptor), también denominados receptores de reconocimiento de patrón (PRR), son capaces de reconocer diferentes estructuras presentes en distintos microorganismos (protozoarios, bacterias, hongos y virus) a través de la interacción con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), lo cual desencadena una cascada de señalización intracelular con la subsiguiente producción de especies reactivas de oxígeno, citocinas inflamatorias, interferones y quimiocinas como respuesta de defensa por parte del huésped. Por esta razón los TLRs se han asociado con múltiples enfermedades inflamatorias como sepsis y cáncer⁽³⁾.

Estudios en individuos con mutaciones específicas en genes para TLR permitieron establecer que la señalización mediada por estos receptores afecta el desarrollo y la progresión de varias enfermedades. El polimorfismo mejor estudiado consiste en la sustitución de un aminoácido, ácido aspártico por glicina en la posición 299 (Asp299Gly), en el dominio extracelular del TLR 4. Este polimorfismo se asoció inicialmente con una disminución de la respuesta de vías aéreas a lipopolisacárido bacteriano (LPS) inhalado, sugiriendo que el TLR4 es crítico en la respuesta a bacterias gramnegativas^(4,5).

En un estudio de asma específicamente asociado con LPS en polvo casero se demostró que las personas con el polimorfismo Asp299Gly tienen un incremento en la gravedad de atopia^(6,7). Mutaciones similares encontradas en humanos en TLR2 (Arg753Gln), TLR2 (Arg677Trp), IRAK4 e I κ B predisponen a infección por estafilococo, TB, neumonía e inmunodeficiencia respectivamente⁽⁵⁾.

El presente estudio tuvo por objetivo determinar la presencia de polimorfismos de TLR 4 (Asp299Gly,

Thr399Ile) y TLR 2 (Arg677Trp, Arg753Gln) en pacientes con asma bronquial y EPOC como modelos de enfermedades humanas inflamatorias crónicas y analizar la posible relación entre estos polimorfismos con la presencia de estas enfermedades y su gravedad.

MÉTODOS

Población de estudio

Se realizó un estudio clínico de casos-controles, descriptivo, transversal prospectivo en el que se incluyeron 2 grupos de pacientes, 100 individuos con diagnóstico de asma bronquial y 100 individuos con diagnóstico de EPOC. Ambos grupos fueron seleccionados de una población de pacientes ambulatorios evaluados en la consulta de neumonología del Hospital Universitario de Caracas de la Universidad Central de Venezuela entre los meses de mayo a octubre de 2005. Asimismo, se escogieron al azar 100 individuos sanos de la misma área geográfica, no fumadores, sin síntomas respiratorios o antecedentes de enfermedades respiratorias y con espirometría normal.

Los pacientes reunieron los criterios clínicos y espirométricos para diagnóstico definitivo de asma bronquial, según el Programa Nacional de Educación en Asma (NAEP, 2007)⁽⁸⁾ y de EPOC según el documento de consenso de la Asociación Americana del Tórax y la Sociedad Respiratoria Europea (ATS/ERS, 2004)⁽⁹⁾.

Acada uno de los participantes en el estudio (pacientes y controles sanos) se les realizó una espirometría (Espirómetro MedGraphics Cardiorespiratory Diagnostic, Medical Graphics Corporation U.S.A.) usando los valores predictivos de referencia de Crapo, con medición del volumen forzado en el primer segundo (VEF₁), capacidad vital forzada (CVF) y la relación VEF₁/CVF en condiciones basales y posterior a la administración de broncodilatador (200 μ g de salbutamol inhalado).

El protocolo de investigación para este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela.

Aislamiento y purificación del ADN

Tanto para los dos grupos de pacientes como para el grupo control se realizó el aislamiento del ADN genómico a partir 200 μ L de leucocitos de sangre periférica utilizando el estuche comercial QIAamp[®] DNA Mini Kit (Laboratorios Qiagen).

Genotipaje de receptores semejantes a Toll 2 y 4

Se realizó la caracterización genotípica de los receptores semejantes a Toll 2 y 4 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según los protocolos descritos por Sánchez y col.⁽¹⁰⁾ (Toll 2) y Lorenz y col.⁽¹¹⁾ (Toll 4). Ambos procedimientos se basaron en la amplificación de secuencias específicas de ADN para estos receptores y la posterior digestión de los amplificadores con enzimas de restricción, lo cual permitió la identificación de regiones polimórficas en tales genes (Tabla 1). La amplificación se realizó en un termociclador MJ-Research (PTC-200[®]) y el protocolo de amplificación tanto para Toll 2 y Toll 4 constó de las siguientes fases: fase inicial: 95° x 4 minutos seguido de 35 ciclos constituidos cada uno por una fase de desnaturalización de 95° x 30 segundos; una fase de hibridación de 56° x 30 segundos; una fase de extensión de 72° x 30 segundos y una fase final de 72° x 7 minutos.

Los productos de PCR digeridos con cada una de las enzimas de restricción fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 4 %, tinción con bromuro de etidio y visualización en el transiluminador de luz UV.

Análisis estadístico

Se calculó la media y la desviación estándar de la edad, índice de masa corporal y del número de paquetes/año. Se calculó la frecuencia y el porcentaje de sexo, raza y gravedad de la enfermedad (basados en los valores

espirométricos y la clasificación clínica de cada paciente según las escalas antes mencionadas). Para relacionar la presencia de polimorfismo de receptores semejantes a Toll 2 y 4 con la presencia de asma bronquial y EPOC y su gravedad se utilizó la prueba de Chi cuadrado de Pearson.

Para comparar los resultados de edad se utilizó el ensayo de ANOVA.

Se consideró un valor estadístico significativo si $P < 0,05$ y altamente significativo si $P < 0,01$.

RESULTADOS

1) Características clínicas de los pacientes con asma bronquial y EPOC.

De los 100 pacientes con asma bronquial, 78 fueron del sexo femenino (78 %) y 22 pacientes del sexo masculino (22 %). De los 100 pacientes con EPOC, 56 fueron del sexo femenino (56 %) y 44 pacientes del sexo masculino (44 %). De los 100 individuos sanos, 77 fueron del sexo femenino (77 %) y 23 pacientes del sexo masculino (23 %). No se observaron diferencias significativas en la distribución por sexo entre los grupos estudiados ($P = 0,14$).

Las características demográficas y clínicas de los pacientes se presentan en la Tabla 1, observándose diferencias significativas en relación a la edad entre los pacientes con asma bronquial o controles con respecto al grupo con EPOC ($P < 0,001$) y en relación al tiempo de evolución en años de la enfermedad en los dos grupos

Tabla 1
Secuencias iniciadoras, enzimas de restricción y tamaño de los amplificadores de la prueba de PCR para TLR2 y TLR4

SNP	Secuencia iniciadora	Enzima de restricción	Temperatura de incubación	Tamaño de los amplificadores
TLR2 Arg677Trp	F: 5'CCTTCAAGTTGTGTCTTCATAAC-3' R: 5'-GGCCACTCCAGGTAGGTCTT-3'	Hpa II	37° C	266 y 33 pb
TLR2 Arg753Gln	F: 5'CCTTCAAGTTGTGTCTTCATAAC-3' R: 5'-GGCCACTCCAGGTAGGTCTT-3'	Aci I	37° C	252 y 37 pb
TLR4 Asp299Gly	F: 5'GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3' R: 5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCAC-3'	Nco I	37° C	223 y 26 pb
TLR4 Thr399Ile	F: 5'GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA-3' R: 5'-ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT-3'	Hinf I	37° C	378 y 25 pb

de pacientes ($P < 0,001$). Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el hábito tabáquico entre los pacientes con asma bronquial y EPOC ($P < 0,01$) entre los no fumadores de ambos grupos y entre los exfumadores.

La clasificación de los pacientes con asma bronquial se realizó según el Programa Nacional de Educación en Asma (NAEP, 2007) en 4 estadios clínicos: 13 pacientes con asma leve intermitente (13 %), 23 pacientes con asma leve persistente (23 %), 32 pacientes con asma moderada persistente (32 %) y 32 pacientes con asma severa persistente (32 %) (Tabla 2). Todos los pacientes con asma bronquial presentaron la prueba con broncodilatador positiva según los criterios de la ATS o ERS: cambio del $VEF_1 \geq 12\%$ y ≥ 200 mL o $VEF_1 \geq 15\%$ respectivamente.

La clasificación clínica de los pacientes con EPOC se realizó según el consenso ATS/ERS (2004) en 4 estadios clínicos: 20 pacientes con EPOC leve (20 %), 40 pacientes con EPOC moderada (40 %), 33 pacientes con EPOC grave (33 %) y 7 pacientes con EPOC muy grave (7 %) (Tabla 3).

2) Evaluación de polimorfismos para receptores Toll 2 y Toll 4 en pacientes con asma bronquial, EPOC y controles sanos.

Tabla 2
Características generales de los pacientes y controles

Variables	Condición clínica		
	Asma bronquial	EPOC	Controles
Edad	44,6±15,22	63,69±9,95	42,63±13,89
Raza			
Mestiza	100	95	100
Caucásica	-	3	-
Negra	-	2	-
IMC* (kg/m ²)	27±5,8	25,5±5,1	26,79±5,25
Paquetes/año**	1,34±4,44	38,30±28,74	
Años de evolución	26,47±16,77	5,56±5,59	

*IMC: Índice de masa corporal
**Paquetes/año= N° de cigarrillos día/20 x N° de años fumando

Tabla 3
Clasificación de los pacientes con asma bronquial según el programa nacional de educación en asma (NAEP, 2007)

Severidad del asma bronquial	N°	%
Leve intermitente	13	13
Leve persistente	23	23
Moderada persistente	32	32
Severa persistente	32	32
Total	100	100

El análisis de la presencia de mutaciones en el receptor semejante a Toll 2 reveló que el 100 % de los individuos estudiados (pacientes y controles sanos) presentó el genotipo salvaje tanto para la posición 677 (genotipo Arg/Arg) como para la posición 753 (genotipo Arg/Arg).

En relación con las mutaciones en el receptor semejante a Toll 4, se encontraron igual número de personas con polimorfismo de este receptor entre los 3 grupos estudiados: 9 pacientes polimórficos con asma bronquial (9 %), 9 pacientes polimórficos con EPOC (9 %) y 9 polimorfismos en controles sanos (9 %). La distribución de los genotipos de TLR4 de pacientes y controles se muestra en la Tabla 4.

No se encontró relación alguna entre la presencia de polimorfismos de receptores semejantes a Toll 4 y la presencia de asma bronquial o EPOC así como con

Tabla 4
Clasificación clínica de los pacientes con EPOC según el consenso de la Asociación Americana del Tórax y la Sociedad Respiratoria Europea (ats/ers, 2004)

Severidad de la EPOC	N°	%
EPOC leve	20	20
EPOC moderado	40	40
EPOC grave	33	33
EPOC muy grave	7	7
Total	100	100

la gravedad de la enfermedad entre los dos grupos de pacientes y entre estos y los controles. Sin embargo, de los 9 pacientes con asma bronquial que mostraron polimorfismos en el receptor semejante a Toll 4, 4 individuos (45 %) presentaron asma bronquial moderada

persistente y 2 (22 %) asma bronquial severa persistente (22 %) (Tabla 5).

De 9 pacientes EPOC que presentaron polimorfismos en el receptor semejante a Toll 4, 5 (56 %) se ubicaron como EPOC grave (Tabla 6).

Tabla 5
Genotipos del receptor semejante a toll 4 en pacientes con asma bronquial, EPOC y controles sanos

Receptor semejante a Toll 4	Controles Sanos		Pacientes con asma bronquial		Pacientes con EPOC	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Aminoácido 299						
Genotipos						
Asp/Asp	92	92	91	91	91	91
Asp/Gly	8	8	9	9	8	8
Gly/Gly	0	0	0	0	1	1
Alelos						
Asp	0,96		0,955		0,95	
Gly	0,04		0,045		0,05	
Aminoácido 399						
Genotipos						
Thr/Thr	94	94	95	95	97	97
Thr/Ile	6	6	4	4	2	2
Ile/Ile	0	0	1	1	1	1
Alelos						
Thr	0,97		0,97		0,98	
Ile	0,03		0,03		0,02	

Tabla 6
Clasificación de los pacientes con asma bronquial con polimorfismos en el receptor semejante a Toll 4

Clasificación clínica del asma bronquial	Nº	%
Leve intermitente	1	11
Leve persistente	2	22
Moderada persistente	4	45
Severa persistente	2	22
Total	9	100

Tabla 7
Clasificación clínica de los pacientes con EPOC que presentaron polimorfismos en el receptor semejante a Toll 4

Clasificación clínica de la EPOC	Nº	%
EPOC leve	2	22
EPOC moderado	2	22
EPOC grave	5	56
Total	9	100

DISCUSIÓN

La muestra de individuos analizados resultó homogénea con respecto al sexo y al índice de masa corporal.

En relación con otras variables estudiadas, se observó que la mayoría de los pacientes con EPOC, a diferencia de los pacientes con diagnóstico de asma bronquial, presentaron hábitos tabáquicos acentuados (>30 paquetes/año), lo cual está en relación directa con su aparición y con su gravedad, pues el tabaquismo es la principal causa de esta enfermedad a nivel mundial⁽⁹⁾. Asimismo observamos que de los 9 pacientes con EPOC que presentaron polimorfismos en el receptor semejante a Toll 4, 8 individuos tuvieron hábitos tabáquicos acentuados (88,8 %).

Diferentes estudios realizados en seres humanos con mutaciones en receptores semejantes a Toll o genes relacionados con estas proteínas, han demostrado que la señalización intracelular mediada por estas moléculas afecta el desarrollo o la progresión de varias enfermedades⁽¹²⁾.

Los polimorfismos en el receptor semejante a Toll 4 se producen por la sustitución de un aminoácido en el dominio extracelular del receptor. Se estima que la frecuencia de estas mutaciones es de 6 % a 10 % en población caucásica^(10,11). Este tipo de polimorfismo consiste en la sustitución de ácido aspártico por glicina en la posición 299 (Asp299Gly) o de treonina por isoleucina en la posición 399 (Thr399Ile). Ambas mutaciones se han relacionado con disminución de la respuesta a endotoxinas (lipopolisacáridos-LPS) en humanos⁽¹³⁾, mayor susceptibilidad de shock séptico por gérmenes gramnegativos⁽¹⁴⁾ y desarrollo de aterosclerosis⁽¹⁵⁾. No se ha demostrado algún efecto del polimorfismo Asp299Gly en la incidencia de patologías de tipo inflamatorio como al asma bronquial⁽¹⁶⁾. Sin embargo, el estudio de asma asociado a lipopolisacárido (LPS) presente en polvo casero muestra que las personas portadoras de este polimorfismo tienen una disminución del riesgo de hiperreactividad bronquial⁽¹⁷⁾. Otro estudio demuestra que las personas que presentan la mutación Asp299Gly tienen un incremento en la severidad de atopia⁽¹⁸⁾.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, realizado en una población predominantemente mestiza, muestran valores similares en la frecuencia de polimorfismo para TLR4 entre individuos con asma, EPOC y controles sanos. Esta frecuencia (9 %) resulta

comparable a lo reportado por otros investigadores en población caucásica^(10,11). Se observaron algunas diferencias, aunque no estadísticamente significativas, en la distribución de estos polimorfismos en cuanto a las sustituciones de los aminoácidos y a la presencia simultánea de ambos genotipos (Asp299Gly y Thr399Ile). La mayoría de los pacientes que presentaron las mutaciones exhibieron un genotipo heterocigoto para cada polimorfismo, con una frecuencia similar a lo encontrado por otros autores^(14,15).

No se encontró relación alguna entre la presencia de polimorfismos en el receptor semejante a Toll 4 y la presencia o gravedad de asma bronquial y EPOC, coincidiendo estas observaciones con lo descrito por otros investigadores^(19,20). Sin embargo, se observó que la mayoría de los pacientes con polimorfismos en este receptor presentaron una enfermedad entre moderada y severa. En el caso de asma bronquial, 4 pacientes (45 %) presentaron un asma moderada persistente y 2 pacientes (22 %) presentaron un asma severa persistente. En cuanto a los pacientes con diagnóstico de EPOC, 5 individuos con polimorfismo para TLR4 (56 %) se clasificaron en una EPOC grave.

En la mayoría de los individuos estudiados (pacientes y controles) se pudo observar la presencia simultánea de ambos polimorfismos para TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile), lo cual se explica por la presencia de un desequilibrio de enlace entre las dos mutaciones, similar a lo reportado por Sánchez y col.⁽¹⁰⁾.

En lo referente al receptor semejante a Toll 2, no se encontraron polimorfismos en los 3 grupos de individuos estudiados, lo cual puede atribuirse al hecho de que tales poblaciones eran predominantemente de origen mestizo y hasta el presente este tipo de mutaciones se han descrito en población caucásica (polimorfismo Arg753Gln) y en población asiática (polimorfismo Arg677Trp)^(21,22).

La presencia de polimorfismos para TLR2 y TLR4 en una población de pacientes constituida predominantemente por individuos mestizos no había sido evaluada anteriormente. Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, pacientes con asma, EPOC e individuos controles sanos, se desconoce si existe alguna relación de estas enfermedades con otros factores de predisposición genética representados por los antígenos del sistema principal de histocompatibilidad HLA o factores que interactúan con regiones promotoras de genes para citocinas proinflamatorias, o que se

encuentran en desequilibrio de enlace con otros mediadores de la respuesta inmune. Investigaciones futuras permitirán esclarecer y determinar el rol de estos factores en la fisiopatología del asma bronquial y la EPOC.

CONCLUSIONES

En los 3 grupos de individuos estudiados, predominantemente mestizos, no se encontraron polimorfismos en el receptor semejante a Toll 2.

En resumen, en el presente estudio se encontró una incidencia del 9 % en el polimorfismo del receptor semejante a Toll 4 en los grupos de pacientes con asma bronquial, EPOC e individuos controles. La presencia de polimorfismo para TLR4 no se relaciona con la gravedad del asma bronquial o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

REFERENCIAS

- Bals R, Hiemstra P S. Inmunidad natural en el pulmón: cómo combaten las células epiteliales los patógenos respiratorios. *Eur Respir J*. 2004;5(3):163-170.
- Modlin R. Mammalian Toll-like receptors. *Ann Allergy, Asth Immunol*. 2002;88:543-548.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol*. 2003;21:335-376.
- Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Advances Immunology*. 2001;78:1-35.
- Yang I A, Holgate S T, Holloway J W. Toll-like receptor polymorphisms and allergic disease: Interpreting the evidence from genetic studies. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:163-166.
- Bhattacharjee R, Akira S. Toll-like receptor signaling: Emerging opportunities in human diseases and medicine. *Current Immunology Reviews*. 2005;1(1):81-90.
- Michel O, LeVan T, Stern D, Dentener M, Thorn J, Gnat D, et al. Systemic responsiveness to lipopolysaccharide and polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene in human beings. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(5):923-929.
- Laloo U, Ainslie G, Wong M, Abdool-Gaffar S, Irusen E, Mash R, et al. Guidelines for the management of chronic asthma in adolescents and adults. *SA Fam Pract*. 2007;49(5):19-31.
- Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: A summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J*. 2004;23:932-946.
- Sánchez E, Orozco G, López-Nevot M A, Jiménez-Alonso J, Martín J. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 2004;63:54-57.
- Lorenz E, Frees K L, Schwartz D A. Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR. *Biotechniques*. 2001;31:22-24.
- Cook D, Pisetsky D, Schwartz D. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology*. 2004;5(10):975-979.
- Arbour N, Lorenz E, Schutte B. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Gen*. 2000;25:187-191.
- Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Shwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*. 2002;162:1028-1032.
- Kiechl S, Lorenz E, Reindl M. Toll like receptor 4 polymorphism and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002;347:18-92.
- Raby BA. Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1449-1456.
- Werner M. TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:323-330.
- Yang IA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and severity of atopy in asthmatics. *Genes Immun*. 2004;5:41-45.
- Savarimuthu SM, Yang IA, Kim ST, Dent AG, Shaw JG, Zimmerman PV, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms in COPD and Asthma. *Respirology*. 2004;18.
- Sabroe I, Wilson AG, Dower SK, Hubbard R, Hall I. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms and COPD. *Thorax*. 2004;59:81.
- Schröder N, Hermann C, Hamann L, Göbel UB, Hartung R, Schumann R. High frequency of polymorphism Arg677Gln of the Toll-like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med*. 2003;81:368-372.
- Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001;31(1):53-58.

CORRESPONDENCIA DIRIGIDA A: Dra. Nancy E. Larocca G. Teléfono: 0212-6053509. E-mail: alaroccaq@cantv.net