

ARTÍCULO ORIGINAL

Expresión del receptor tipo-Toll 4 en la inflamación alérgica de niños asmáticos-obesos

Toll-Like receptor 4 expression in obese asthmatic children with allergic inflammation

Mercedes Monserrat Pacheco-Martínez,¹ Omar Saucedo-Ramírez,² Blanca Del Rio Navarro,² Jaime Del Rio-Chivardi,² Miguel Cruz,³ Gloria Erandi Pérez-Figueroa,¹ Sara Huerta-Yépez,¹ Carmen Maldonado-Bernal¹

RESUMEN

Introducción. El asma se caracteriza por la inflamación de las vías respiratorias y la obesidad por la inflamación sistémica persistente. La exposición a lipopolisacáridos influye en el desarrollo y severidad del asma. El receptor tipo-Toll 4 reconoce a los lipopolisacáridos y dirige la respuesta de las células T cooperadoras. A la fecha, se desconoce el nivel de expresión del receptor tipo-Toll 4 en pacientes con asma-obesidad.

Métodos. Este es un estudio piloto de pacientes con asma-obesidad, con asma, con obesidad y aparentemente sanos. Mediante inmunocitoquímica se determinó el nivel de expresión del receptor tipo-Toll 4 utilizando anticuerpos específicos anti-TLR4, bloqueando los receptores Fc. Con un microscopio *Olimp BX-40* se evaluaron 100 células por laminilla. Las diferencias en el número y el grado de células positivas se estableció mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn *post hoc*.

Resultados. La expresión del receptor tipo-Toll 4 en las células del grupo de pacientes asmáticos fue considerablemente mayor que en el grupo de individuos sanos y mayor que en cualquiera de los otros dos grupos. En el grupo de pacientes obesos el receptor tipo-Toll 4 se expresó menos que en el grupo de individuos sanos y que en los otros dos grupos ($p < 0.001$). El grupo de pacientes asmáticos-obesos no mostró diferencia significativa con respecto al grupo de sanos. Adicionalmente, se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes ($p < 0.05$).

Conclusiones. La expresión del receptor tipo-Toll 4 resultó diferente en cada uno de los tres grupos de pacientes; la expresión elevada en el grupo de pacientes asmáticos probablemente puede explicar la alta sensibilización a lipopolisacáridos o a otros ligandos del receptor tipo-Toll 4. En este trabajo, por primera vez, se muestra el nivel de expresión del receptor tipo-Toll 4 en pacientes asmáticos-obesos.

Palabras clave: asma, obesidad, receptor tipo-Toll 4, inflamación.

ABSTRACT

Background. Asthma is characterized by chronic inflammation of airways and obesity by persistent systemic inflammation. Exposure to lipopolysaccharide (LPS) may induce the development and severity of asthma. Toll like-receptor 4 (TLR4) recognizes LPS and can direct the response of T-helper cells. Level of expression of TLR4 in patients with asthma and obesity is currently unknown.

Methods. We conducted a pilot study that included patients with asthma-obesity, asthma, obesity and those who were apparently healthy. Using immunocytochemistry, we determined the level of expression of TLR4 with specific anti-TLR4 monoclonal antibody, blocking Fc receptors. With a BX-40 Olympus microscope, 100 cells were evaluated per slide. Differences in the number and degree of positive cells were established by Kruskal-Wallis test and Dunn *post hoc* analysis.

Results. Expression of TLR4 in the cells of the asthmatic group of patients was significantly greater than in the healthy group of patients and higher than any of the other two groups. Conversely, the obese group expressed less TLR4 than the healthy group and any of the other two groups ($P < 0.001$). The asthma-obese group showed no significant difference with respect to healthy controls. Additionally, we observed significant differences among the three groups of patients ($P < 0.05$).

Conclusions. TLR4 expression was different in the three groups of patients. The highest level in the asthmatic patient may be explained by the high sensitivity to LPS or to other TLR4 ligands. This is the first study to show the level of expression in obese patients with asthma.

Key Words: asthma, obesity, Toll-like receptor 4, inflammation.

¹ Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas,
² Departamento de Alergia e Inmunología, Hospital Infantil de México Federico Gómez;
³ Unidad de Investigación en Bioquímica, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional SXXI,

Instituto Mexicano del Seguro Social
México D.F., México

Fecha de recepción: 31-08-10
Fecha de aceptación: 15-04-11

INTRODUCCIÓN

La obesidad y el asma son enfermedades crónicas cuya prevalencia ha aumentado a escala mundial durante las últimas décadas, fenómeno comprobado en diversos estudios longitudinales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha denominado a estas enfermedades como “epidemias del nuevo siglo”. Se estima que más de 300 millones de personas padecen asma. En el siglo pasado el asma presentó un incremento importante hasta la década de los 90, cuando comenzó una fase de meseta que hasta hoy continúa.¹ Mediante el Estudio Internacional de Asma y Alergia en la Infancia (siglas en inglés ISAAC)² se ha podido estandarizar y comparar su frecuencia; hasta el último reporte de 2009 era de 6.8 a 21.7% en el grupo de escolares y de 5.1 a 22% en adolescentes.³ En la Ciudad de México existe una frecuencia de entre 3.6 y 6.8% en los escolares y de entre 3.9 y 10% en los adolescentes.⁴ La tasa de mortalidad en nuestro país es de 14.5 muertes por cada 100 mil habitantes (aproximadamente 4 000 muertes al año), una de las más altas en América.⁵

La obesidad se encuentra entre las principales enfermedades de los adolescentes. El exceso de peso (sobrepeso/obesidad) en este grupo es de cerca de 30%.⁶ Su prevalencia se ha incrementado a más del doble en los últimos 20 años, sin mostrar signos de disminución epidemiológica. En la población infantil se ha presentado el mayor porcentaje de incremento, al igual que de las comorbilidades y complicaciones.⁷ En México, la Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT) del 2000 determinó que la obesidad fue de 6.8 a 10% en mujeres y de 9.2 a 11.8% en hombres en un grupo de 12 a 17 años. Si se considera únicamente el área metropolitana, la obesidad y el sobrepeso incrementan sus cifras a 28% en hombres y a 30.1% en mujeres.⁸

Algunos estudios longitudinales indican que la obesidad antecede al asma y que el riesgo relativo de incidencia de asma es directamente proporcional al incremento de la obesidad.⁹ Parecería que el asma predispone a la obesidad y que la obesidad empeora el asma.¹⁰ En ambos padecimientos existe inflamación.¹¹ Los receptores tipo-Toll (TLR) están involucrados en la respuesta inflamatoria, por lo que es necesario conocer cómo se modifica su expresión en niños con asma y obesidad.

El asma se caracteriza por la inflamación crónica de las vías respiratorias, con la presencia continua e incrementada de linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2), eosinófilos y

neutrófilos.¹¹ El mecanismo involucrado en la generación de la respuesta Th2, inherente a antígenos inhalados, es desconocido. La evidencia epidemiológica sugiere que la exposición a lipopolisacáridos (LPS) puede influir en el desarrollo y la severidad del asma. Sin embargo, el mecanismo por el cual el LPS influye en la patogénesis del asma permanece sin definir, aún cuando se sabe que la señalización a través de los TLR se requiere para dirigir la respuesta generada por las células T cooperadoras. Se ha reportado que, en modelos murinos de sensibilización alérgica, bajos niveles de LPS inhalados generan una señalización a través del receptor tipo-Toll 4 (TLR4) y que éste es necesario para inducir respuestas del tipo Th2 a los antígenos inhalados. El mecanismo por el cual los LPS dan una señalización que origina una respuesta Th2 involucra la activación de células dendríticas.¹² En contraste con los bajos niveles, la inhalación de altos niveles de LPS con los antígenos originan respuestas Th1. Estos estudios han sugerido que el nivel de exposición a LPS puede determinar el tipo de respuesta inflamatoria generada y ofrecer una posible explicación epidemiológica sobre la exposición a la endotoxina y la prevalencia del asma.¹³ Sin embargo, sabemos que los LPS no son los únicos ligandos del TLR4 y que, adicionalmente, puede haber ligandos endógenos y contaminantes ambientales que pueden participar en la respuesta inflamatoria que se presenta en el asma y en la obesidad.

Dada la importancia de la participación del TLR4 en el reconocimiento de LPS y otros ligandos, el objetivo de este trabajo fue determinar el nivel de expresión del TLR4 en pacientes con respuesta inflamatoria por asma y obesidad.

MÉTODOS

Se realizó un estudio piloto en el que se incluyó un grupo de 10 pacientes escolares asmáticos con obesidad que acudieron de manera regular al servicio de Alergia e Inmunología y a la clínica de Obesidad del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Los pacientes fueron de ambos géneros, en edad escolar (6 a 12 años) con obesidad y con asma. Como controles se incluyeron 10 niños con obesidad sin ningún problema respiratorio, 10 niños con asma sin obesidad y 10 niños aparentemente sanos sin antecedentes de obesidad o de asma.

Los criterios clínicos para el diagnóstico del asma alérgica intermitente o leve persistente fueron los siguien-

tes: presencia de tos, disnea y sibilancias de 3 meses de evolución o, por lo menos, 2 episodios de broncoespasmo en los últimos 12 meses y pruebas cutáneas positivas para uno o más aeroalergenos.

Los controles sanos fueron niños escolares con el mismo rango de edad sin ninguna enfermedad asociada, sin asma ni obesidad.

Ninguno de los niños incluidos en el estudio presentó alteraciones del sistema inmune, enfermedades reumáticas, enfermedades crónico-degenerativas o trastornos del metabolismo diferentes a obesidad y ningún proceso infeccioso en los últimos 30 días previos al estudio y no utilizaron esteroides sistémicos o tópicos en las últimas 8 semanas.

Purificación de células mononucleares de sangre periférica y preparación de laminillas

Se tomó una muestra de 5 ml de sangre periférica en un tubo vacutainer con EDTA (etilendiaminotetraacético) como anticoagulante y se realizó la obtención de las células mononucleares mediante la separación por gradiente de densidad empleando Lymphoprep™ (*Axis-Shield PoC, AS, Oslo, Norway*). Previamente, se realizó una dilución 1:2 de la sangre con solución salina en un tubo de 15 ml (*Falcon®* estéril); se centrifugó a 1750 rpm por 30 minutos y se extrajo la banda de células mononucleares. Se lavaron 2 veces con solución salina centrifugando a 1500 rpm durante 10 minutos. Las células se tiñeron con azul de tripano y se contaron en la cámara de Neubauer (*Neubauer improved, Tiefe depth profunder 0.100 mm, Marienfeld, Alemania*) bajo microscopía de luz (10×). Se realizó el cálculo para obtener la cantidad de células totales en 1 ml; con el valor obtenido se ajustó la cantidad de células a 10,000 células/μl y se colocaron en tubos de 1.5 ml (Eppendorf estériles, volumen: 2 ml). Se les adicionó 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos 1× (PBS 1× pH 7.2) para proceder a colocar los spots en las laminillas (portaobjetos esmerilados de 25 × 75 mm, *Madesa de México*).

Las laminillas se secaron a temperatura ambiente, se rotularon y se fijaron las células con formaldehído al 4% por 20 min a 4°C. Posteriormente se dio un lavado con PBS 1× por 5 minutos para retirar los residuos de formaldehído.

Finalmente, las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron para su posterior inmunotinción.

Inmunocitoquímica

A partir de las laminillas con células preparadas se procedió a la realización de la inmunotinción. Se realizó la recuperación antigénica con citrato de sodio (pH 6, 0.01 M) por 20 min a 90°C en baño maría, se realizaron dos lavados con PBS 1×. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 min (dos veces) y se realizó el bloqueo de los receptores Fc con suero normal de cerdo al 2% durante 2 horas en la cámara húmeda y a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó avidina/biotina, se incubó por 15 min cada una y se dieron 3 lavados de 5 min. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a incubar con los anticuerpos anti-TLR4 o control de isotipo 1:500 (anticuerpo monoclonal de ratón anti-TLR4 humano e IgG normal de ratón, *Santa Cruz, Biotechnology*) en la cámara húmeda toda la noche a temperatura ambiente.

Después de la incubación se realizaron 5 lavados de 8 min para retirar los residuos de cada uno de los anticuerpos; posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a biotina por 30 min a temperatura ambiente en la cámara húmeda. Una vez transcurrido el tiempo se realizó el lavado con PBS 1× por 5 minutos, se adicionó estreptavidina conjugada a HRP (*Horseradish peroxidase, Universal LSAB+KIT/HRP, DAKO Cytomation®*) por 30 minutos. Finalmente, el color se generó mediante la adición del sustrato con el cromógeno diaminobencidina (*Diaminobenzidine, DAB®*) durante el tiempo requerido de cada anticuerpo con respecto al control de isotipo. Se detuvo la reacción con agua y se contratiñó con hematoxilina.

Las muestras se deshidrataron con agua destilada, etanol a 70, a 90, a 100% y xileno en baños subsecuentes de 5 min cada uno. Las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Cuantificación de las células positivas inmunoteñidas

Las laminillas se analizaron en un microscopio *Olympus BX-40* y las células positivas (color café) se clasificaron de acuerdo con la intensidad del color. Se contaron 100 células en cada laminilla.

Análisis estadístico

Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando un programa de análisis estadístico (Sigma Stat y Sigma Plot Software®). La evaluación de la diferencia en

el número y grado de células positivas de las reacciones inmunocitoquímicas se realizó mediante los análisis de Kruskal Wallis y Dunn *post hoc*.

RESULTADOS

Nivel de Expresión del TLR4

Se evaluó el nivel de expresión de TLR4 tomando en cuenta el porcentaje de células positivas para cada grupo y el nivel de expresión: bajo (1), moderado (2) y alto (3). Se analizaron 100 células de cada muestra de pacientes o controles sanos. Se encontró que las células mononucleares del grupo de sanos mostraron una alta expresión de TLR4 (45%), mientras que solo 22 y 28% mostraron baja y moderada expresión, respectivamente y 5% de las células no expresó el receptor. El grupo de obesos mostró una alta expresión en menos de 20% de las células y moderada y baja expresión en 55% y 22% de las células, respectivamente. El grupo de asmáticos presentó alta expresión del TLR4 en 60% de las células y moderada y baja expresión en 22 y 10%, respectivamente, observándose en este grupo la mayor expresión. No sucedió así en el grupo de asmáticos obesos donde la mayor expresión fue en 40% de las células y las expresiones moderada y baja en menos de 40 y 5%, respectivamente; fue notorio que aproximadamente 20% de las células no expresó el receptor (Figura 1).

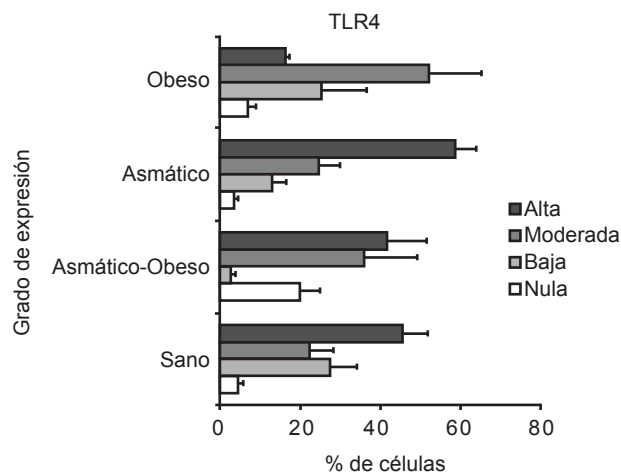


Figura 1. Grado de expresión del TLR4 en las células mononucleares de sangre periférica. Se determinó el nivel de expresión del TLR4 en 100 células de cada paciente o control sano de los diferentes grupos estudiados. Se calificaron como alta (3), moderada (2), baja (1) o nula expresión (0).

Se realizó el análisis estadístico y se observó que la mediana de la expresión en las células mononucleares del grupo de asmáticos fue considerablemente mayor a la del grupo control de sanos (3 y 1, respectivamente) y mayor que cualquiera de los otros grupos (3 y 2, respectivamente) (Figura 2). Con el análisis de varianza de Kruskal Wallis se encontró que el grupo de obesos expresa menos TLR4 que el grupo de sanos y que el grupo de asmáticos tiene una mayor expresión que el grupo de sanos; estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p < 0.001$). Sin embargo, el grupo de asmáticos-obesos no mostró diferencia significativa con respecto al grupo de sanos. También se analizó la diferencia en la expresión del TLR4 entre los distintos grupos incluidos en el estudio, utilizando la prueba de Dunn *post hoc*, y se encontraron diferencias significativas entre el grupo de obesos y el de asmáticos, entre el grupo de obesos y el de asmáticos-obesos, así como entre el grupo de asmáticos y el de asmáticos-obesos, con una $p < 0.05$.

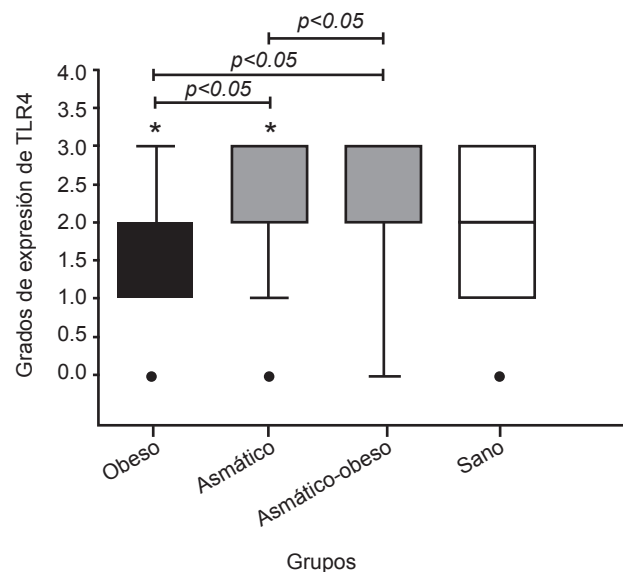


Figura 2. Análisis estadístico de los resultados de la expresión del TLR4. Se muestran las medianas y los rangos de variación de la expresión de TLR4 en los diferentes grupos incluidos en el estudio: obesos (1), asmáticos (2), asmáticos-obesos (3) y sanos (4). * $p < 0.001$: diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de sanos obtenida mediante el análisis de la varianza de Kruskal-Wallis de una vía. El análisis de la diferencia entre los grupos se realizó con el método de Dunn *post hoc*, tomando como diferencia significativa $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

La respuesta del sistema inmunitario innato al LPS puede modular la respuesta inmunitaria adaptativa a los alérgenos. Estudios recientes con modelos murinos reportan que la sensibilización a los aeroalergenos con dosis bajas de LPS (0.1 µg) inducen una respuesta tipo Th2 en fenotipos asmáticos, presentándose los síntomas propios del asma como hiperreactividad bronquial e inflamación eosinofílica. Por el contrario, la sensibilización alérgica con altas dosis de LPS (10 µg) no desarrolla los síntomas del asma. Estos hallazgos sugieren que los niveles de exposición de las vías respiratorias a LPS inducen diferentes formas de asma, que pueden diferenciarse en los fenotipos 1 y 2 por diferentes niveles de LPS, alto y bajo, respectivamente.¹⁴

El hecho de que la obesidad agrave el asma puede explicarse parcialmente mediante los efectos mecánicos de la obesidad sobre el aparato respiratorio. La obesidad produce una disminución del volumen corriente y de la capacidad residual funcional; estos cambios tienen como consecuencia una reducción en el estiramiento del músculo liso y, de esta forma, la habilidad para responder al estrés fisiológico. El músculo liso intrínsecamente tiene ciclos de excitación y contracción; sin embargo, estos ciclos son más cortos en los obesos, lo que se asocia a la disminución en su capacidad funcional y da como resultado una conversión de los ciclos rápidos de actina-miosina hacia ciclos más lentos.¹⁵ Desafortunadamente, la exacta relación de dosis-efecto entre la cantidad y/o distribución de la grasa corporal y los cambios en la mecánica respiratoria aún son desconocidos.

Por otro lado, el efecto de la respuesta inflamatoria generada durante la obesidad sobre la respuesta inflamatoria observada en el asma, se desconoce. Se ha reportado que existe una asociación entre la obesidad y el asma y diversos marcadores inflamatorios, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), citocinas como IL-6 e IL-1β y la proteína C-reactiva. Se ha demostrado que la IL-6 y el TNF-α se expresan en los adipocitos y se correlacionan directamente con la grasa corporal total. Por otra parte, los niveles de TNF-α también están aumentados en el asma y están relacionados con la producción de IL-4 e IL-5 (citocinas de tipo Th2) por el epitelio bronquial y de IL-6 e IL-1β (citocinas de tipo Th1).¹¹ Todas estas citocinas son producidas como respuesta a la estimulación de receptores tipo-Toll dentro de los cuales se encuentra el TLR4.¹⁶ El

TLR4 se ha asociado con la respuesta inflamatoria en el asma por la sensibilización que puede generarse por LPS de bacterias Gram negativas.

En este estudio observamos que la expresión del TLR4 fue considerablemente mayor en el grupo de asmáticos con respecto al grupo de sanos y a los otros dos grupos (obesos y asmáticos-obesos), lo que probablemente puede explicar la alta sensibilización de los pacientes asmáticos al LPS o a otros ligandos del TLR4. El grupo de obesos fue el que presentó menor expresión del TLR4, lo que puede explicar la expresión encontrada en el grupo de asmáticos-obesos, que no presentó diferencia significativa con respecto al grupo de sanos, aun cuando entre los tres grupos de pacientes las diferencias fueron estadísticamente significativas.

La relación entre asma y LPS sólo está documentada en la vía aérea y el presente trabajo se realizó con sangre periférica. Esto obedeció a que se consideró importante conocer la expresión a nivel sistémico y no local porque, además de los pacientes con asma, se incluyeron pacientes con obesidad que se sabe que cursan con una inflamación sistémica, y pacientes con ambos padecimientos: asma y obesidad.

Este es el primer estudio realizado para conocer el nivel de expresión del TLR4 en pacientes con asma y obesidad. Como observamos, en el grupo de obesos el TLR4 está disminuido y en el grupo de asmáticos está incrementado de manera importante comparados con el del grupo de sujetos sanos, lo que indica que estas enfermedades afectan de forma diferenciada la expresión de dicho receptor y con ello, probablemente, la respuesta inflamatoria. Sin embargo, se requieren más estudios para poder determinar la relevancia de estos hallazgos en la fisiopatología del asma y la obesidad.

Autor de correspondencia: Dra. Carmen Maldonado Bernal

Correo electrónico: cmaldobe@yahoo.com

REFERENCIAS

1. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Götz M, European Pediatric Asthma Group. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy* 2008;63:5-34.
2. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in preva-

- lence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 1998;351:1225-1232.
3. Lai CK, Beasley R, Crane J, Foliaki S, Shah J, Weiland S; International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase Three Study Group. Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 2009; 64(6):476-483.
4. Del-Rio-Navarro B, Del-Rio-Chivardi JM, Berber A, Sienra-Monge JJ, Rosas-Vargas MA, Baeza-Bacab M. Asthma prevalence in children living in north Mexico City and a comparison with other Latin American cities and world regions. *Allergy Asthma Proc* 2006;27:334-340.
5. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R; Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004;59:469-478.
6. Santos-Preciado JI, Villa-Barragán JP, García-Avilés MA, León-Álvarez G, Quezada-Bolaños S, Tapia-Conyer R. La transición epidemiológica de las y los adolescentes en México. *Salud Pública Méx* 2003;45(suppl. 1):140-152.
7. Gennuso J, Epstein LH, Paluch RA, Cerny F. The relationship between asthma and obesity in urban minority children and adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1998;152:1197-1200.
8. Del Río-Navarro BE, Velázquez-Monroy O, Sánchez-Castillo CP, Lara-Esqueda A, Berber A, Fanghänel G, et al. The high prevalence of overweight and obesity in Mexican children. *Obes Res* 2004;12:215-223.
9. Saint-Pierre P, Bourdin A, Chanez P, Daures JP, Godard P. Are overweight asthmatics more difficult to control? *Allergy* 2006;61:79-84.
10. Gilliland FD, Berhane K, Islam T, McConnell R, Gauderman WJ, Gilliland SS, et al. Obesity and the risk of newly diagnosed asthma in school-age children. *Am J Epidemiol* 2003;158:406-415.
11. Segura NH, Hernández L, Velázquez C, Rodríguez J, Murillo E. Asthma and obesity: related inflammatory diseases. *Rev Alerg Mex* 2007;54:24-28.
12. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 2008;8:193-204.
13. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 2002;196:1645-1651.
14. Kim YK, Oh, SY, Jeon SG, Park HW, Lee SY, Chun EY, et al. Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol* 2007;178:5375-5382.
15. Sontag SJ. Gastroesophageal reflux disease and asthma. *J Clin Gastroenterol* 2000;30(suppl. 3):S9-S30.
16. Akira S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009;85:143-156.