



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA**

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“NIVELES SÉRICOS DE LA PROTEÍNA
QUIMIOATRAYENTE DE MONOCITOS 1 Y SU RELACIÓN
CON LOS POLIMORFISMOS -2518 A/G Y -927 G/C EN SU
GEN EN NIÑOS CON OBESIDAD”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A:

Q.B.P. INES MATIA GARCIA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ISELA PARRA ROJAS

CODIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ FRANCISCO MUÑOZ VALLE

CHILPANCINGO, GRO., DICIEMBRE DE 2011.

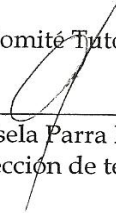



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

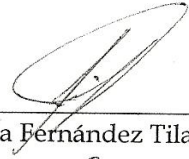
APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 2 días del mes de septiembre de dos mil once, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Niveles séricos de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 y su relación con los polimorfismos -2518 A/G y -927 G/C en su gen en niños con obesidad", presentada por la alumna Ines Matia García, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dra. Isela Parra Rojas
Dirección de tesis


Dr. José Francisco Muñoz Valle
Codirección de tesis

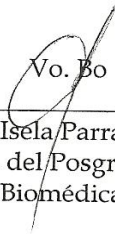

Dra. Gloria Fernández Tilapa


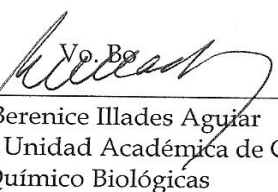

Dra. Natividad Castro Alarcón


Dr. Lorenzo Salgado Goytia



Vo. Bo


Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias
Biomédicas


Vo. Bo

Dra. Berenice Illades Aguilar
Directora de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Isela Parra Rojas.

Codirección de:

Dr. José Francisco Muñoz Valle

La asesoría de:

Dra. Gloria Fernández Tilapa

Dra. Natividad Castro Alarcón

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento del Fondo de Investigación Básica SEP-CONACYT 2008-01(No. 106734).

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Ines Matia Garcia, recibió beca del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de Tesis la **Dra. Isela Parra Rojas**, agradezco de manera muy especial por confiar en mi para la realización de este trabajo, pero sobre todo por el apoyo y la amistad que me ha brindado, mil gracias por el cariño que siempre he recibido de usted y todas sus enseñanzas que me han impulsado a seguir adelante y luchar por mis sueños. Le reitero que la quiero mucho Dra. Isela... Gracias.

A mi codirector de tesis el **Dr. José Francisco Muñoz Valle**, gracias por su apoyo, sus consejos y sus valiosas enseñanzas y aportaciones para la culminación de este trabajo, debo agradecer también su amabilidad y disponibilidad durante mi estancia en su laboratorio en la Ciudad de Guadalajara; pero sobre todo por brindarme su amistad, Muchas gracias Dr. Francisco.

A mis sinodales, **Dra. Gloria Fernández Tilapa y Dra. Natividad Castro Alarcón**, gracias por sus valiosas aportaciones, enseñanzas y el tiempo dedicado a la realización de este trabajo. **Dr. Lorenzo Salgado Goytia** por su disponibilidad para apoyarme en el desarrollo de este trabajo, por compartir sus experiencias y enseñanzas, gracias por brindarme su sincera amistad.

A mis compañeros de generación de la maestría, por todos los momentos que compartimos durante estos dos años, les deseo de todo corazón mucho éxito a todos.

A todos mis amigos: que son muchos y no terminaría de mencionarlos muchas gracias por enseñarme el valor de la amistad y por todos los momentos que hemos pasado juntos, siempre los llevo en mi corazón.

Ramón, Jorge, Veranyer y José Ángel, siempre recordaremos nuestras desveladas estudiando, apoyándonos para leer esos artículos, siempre pueden contar conmigo.

A mis compañeros de laboratorio, **Samuel, Anahí, Luz Elena (lucecita)** y todos los que forman parte del Laboratorio de investigación en Obesidad y Diabetes, que compartimos muchos momentos e hicieron agradable el trabajo en el laboratorio, gracias **Adrián** y **Ulises** por su apoyo y ayuda en las técnicas de laboratorio y su disponibilidad que siempre tuvieron para ayudarme, siempre podrán contar con mi amistad.

A la **Q. B. P. Aralia**, por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio y por su valiosa amistad, gracias por escucharme y decirme esas palabras de aliento cuando me desespero, y por todos los momentos que hemos compartido gracias.

A la **Dra. Paola**, por sus valiosas aportaciones para este trabajo, pero sobre todo por su amistad y consejos que me han ayudado a seguir adelante.

A la Biol. **Paola Macedo**, por su amabilidad y disponibilidad para la realización de todos los trámites administrativos, muchas gracias, puedes contar con mi amistad siempre.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la vida y la hermosa familia que me ha llenado de felicidad.

A mis padres Apolinar y Faustina: Por darme la enseñanza hacia Dios y por todo su amor y su apoyo que siempre me han brindado, por forjarme con buenos principios y cuidar de mí siempre. Por creer en mí y compartir esta satisfacción de terminar mis estudios, siempre los llevo en mi pensamiento y mi corazón, los quiero mucho, gracias por ser mis papás.

A mis hermanos José Fernando, María Yeni, Leslie Monserrat, Samanta Ruth y Kermith Jair (q.e.p.d): Por ser un gran apoyo en mi vida y los mejores hermanos y amigos que tengo, porque siempre me han impulsado a seguir adelante, gracias por todo su cariño, les reitero que los quiero mucho y que siempre cuentan con mi apoyo.

A mis abuelos y tíos: Por el cariño y comprensión que me han brindado e impulsado a seguir adelante con sus sabios consejos.

A Isaías: Por el amor y apoyo que me ha brindado siempre, por los buenos consejos y por estar siempre con una palabra de aliento cuando lo he necesitado.

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Material y métodos	9
Resultados	13
Discusión	19
Conclusiones	25
Referencias	26

RESUMEN

La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) es una quimiocina que regula la migración e infiltración de monocitos, macrófagos, células T de memoria, basófilos y células natural killer (NK) al sitio de inflamación y juega un papel importante en la iniciación y patogénesis de las enfermedades cardiovasculares. Polimorfismos en la región reguladora de *MCP-1* se han relacionado con las concentraciones séricas de MCP-1 y el riesgo para enfermedades crónicas e infecciosas. **Objetivo.** Evaluar la relación entre los niveles séricos de la MCP-1 con los polimorfismos -927 G/C y -2518 A/G en su gen, en niños con obesidad. **Material y métodos.** Se analizaron 225 niños(as) de 6 a 13 años de edad, que se integraron en dos grupos: 119 niños con peso normal y 106 con obesidad. Se obtuvieron las mediciones antropométricas, bioquímicas y de la presión arterial. Los niveles séricos de la MCP-1 se determinaron por ensayo inmunoenzimático ligado a enzima (ELISA), y la genotipificación de ambos polimorfismos se realizó por PCR-RFLPs. **Resultados.** Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo -2518 A/G en el gen de *MCP-1* en la población total fueron: AA 16%, AG 47% y GG 37%; y alélicas A 40% y G 60%. Para el polimorfismo-927 G/C en el gen de *MCP-1* fueron: GG 77%, GC 22%, y CC 1%; y alélicas: G 88% y C 12%. Las concentraciones séricas de MCP-1 fueron más altas en los niños con obesidad en comparación con los de peso normal, y los niños presentaron niveles más altos que las niñas. Los portadores de los genotipos -2518AA y -927GC presentaron un leve incremento en los niveles séricos de MCP-1. Los niveles séricos de la proteína se asociaron con IMC, circunferencia de cintura, cadera, brazo, insulina e índice HOMA. **Conclusiones.** Los niveles séricos de la MCP-1 no se relacionaron con los polimorfismos -2518 A/G y -927 G/C en su gen, pero sí con la obesidad, insulinemia e índice HOMA.

Palabras clave. Polimorfismo, obesidad, MCP-1, niños.

ABSTRACT

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is a chemokine that regulates migration and infiltration of monocytes, macrophages, memory T cells, basophils and natural killer (NK) cells to the site of inflammation and plays an important role in the initiation and pathogenesis of cardiovascular disease. Polymorphisms in the regulatory region of *MCP-1* have been associated with serum MCP-1 levels and risk for chronic and infectious diseases. **Aim.** To assess the relationship between serum MCP-1 levels with -2518 A/G and -927 G/C *MCP-1* polymorphisms in obese children. **Material and methods.** Were included 220 children, with age range 6-13 years, which were integrated into two groups: 119 children with normal weight and 106 children diagnosed with obesity. Previously, were obtained anthropometric, biochemical and blood pressure measurements. The serum MCP-1 levels were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the genotyping of both polymorphisms was performed by PCR-RFLP. **Results.** The genotype frequencies in the total population were AA 16%, GG 47%, AG 37% and allele A 40% and G 60% for the -2518 A/G *MCP-1* polymorphism, and GG 77%, GC 22%, CC 1%, and allele G 88% and C 12% for -927 G/C *MCP-1* polymorphism. MCP-1 concentrations were higher in obese children compared with those normal weights, and by gender the boys had higher MCP-1 levels than girls. Carriers of -2518AA and -927GC genotype showed a slight increase in serum MCP-1. The serum MCP-1 levels were associated with BMI, waist circumference, hip, arm, insulin and HOMA index. **Conclusions.** Serum levels of the protein were not associated with the -2518 A/G and -927 G/C *MCP-1* polymorphisms, but with obesity, insulin and HOMA index.

Keywords. Polymorphism, obesity, MCP-1, children.

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de sobrepeso y obesidad infantil se ha incrementado en más de la mitad de los países de economías emergentes (Ramírez-López *et al.*, 2005). De acuerdo a los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUTEF 2006) por entidad federativa, en Guerrero se reportó una prevalencia de sobrepeso de 10.8% en niños y 12.7% en niñas; la obesidad se ubicó en 4.4% de los niños y 5.4% de las niñas (Shamah-Levy *et al.*, 2007). En el 2006, Alves *et al.*, publicaron un estudio transversal en 700 niños en edad escolar, de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, encontrando una prevalencia de sobrepeso y obesidad de 28.1% y 13.7%, respectivamente (Alves de Moraes *et al.*, 2006).

La obesidad es una enfermedad crónica, compleja y multifactorial que suele iniciarse en la infancia y la adolescencia, y que se establece por un desequilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético (Ekelund *et al.*, 2006; Jolliffe *et al.*, 2006; Guerrero-Fdez., 2008). Actualmente, se conoce que en la obesidad se presenta un estado de inflamación sistémica crónica de grado bajo, que se asocia con el aumento del tejido adiposo visceral, el cual produce mediadores importantes de la inflamación, como son interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), resistina, interleucina-8 (IL-8), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), e interleucina 1- β (IL-1 β). (Gustafson *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2005).

Anteriormente, se pensaba que los niños obesos no desarrollaban problemas cardiovasculares hasta que llegaban a la edad adulta. Sin embargo, actualmente se considera que la obesidad infantil es un factor que aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como son las dislipidemias, resistencia a la insulina (RI), enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y aterosclerosis (Jolliffe *et al.*, 2006; Beauloye *et al.*, 2007; Daniels *et al.*, 2008). Considerando la importancia del papel de la inflamación en la aterogénesis, se han evaluado mediadores de la inflamación, como proteína C reactiva (CRP), leptina, TNF- α , resistina, IL-6, y la MCP-1, que juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Cachofeiro *et al.*, 2006; Aukrust *et al.*, 2008; Yasua

et al., 2009). Los niveles séricos de la MCP-1, reportados en adultos por Kouyama *et al.*, en el 2007, demuestran que las concentraciones séricas se incrementan en sujetos obesos con DMT2 (317.4 ± 111.7 pg/mL), en comparación con los sujetos que solo presentaron DMT2 (302.7 ± 102.4 pg/mL) (Kouyama *et al.*, 2007). En población infantil hay pocos estudios donde se han determinado los niveles séricos de MCP-1. En el 2008, Cai *et al.*, analizaron niños hispanos con obesidad, y encontraron que los niveles séricos de la proteína fueron de 317 ± 117 pg/mL en niños y de 309 ± 117 pg/mL en niñas (Cai *et al.*, 2008). En el 2009, Zineh *et al.*, realizaron otro estudio en niños con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), y encontraron niveles séricos de MCP-1 significativamente más altos en el grupo con DMT1 (5.75 ± 0.39 pg/mL), comparado con el grupo control (5.36 ± 0.45 pg/mL) ($p < 0.001$) (Zineh *et al.*, 2009).

La aterosclerosis es una enfermedad crónica, que se caracteriza por lesiones focales arteriales que contienen colesterol, fibrosis, infiltrados de células inflamatorias, acumulación de macrófagos en la íntima arterial y proliferación de células del músculo liso vascular. También se caracteriza por ser un proceso inflamatorio, cuya regulación depende de una red compleja de señalización de citocinas y quimiocinas (Chen *et al.*, 2009; Daniels and Greer, 2008; Aukrust *et al.*, 2008; Raines and Ferri, 2005). Recientes estudios en niños indican que el proceso de aterosclerosis inicia a edad temprana y está asociado a la obesidad, ya que el tejido adiposo es un órgano endocrino y paracrino activo que libera un gran número de citocinas y mediadores bioactivos, llamadas adipocinas, que influyen no solo en la homeostasis del peso corporal, sino también en la inflamación, la coagulación y fibrinólisis, que contribuyen al daño vascular y a la aterogénesis (Lau *et al.*, 2005; Aukrust *et al.*, 2008).

El endotelio vascular controla la homeostasis del tono vascular, permeabilidad, coagulación, fibrinólisis, proliferación celular y la respuesta antiinflamatoria (Peydró, 2005). El deterioro en la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) y mediadores de la inflamación en la obesidad como son el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), angiotensinógeno, resistina, CRP y quimiocinas como la MCP-1 inducen una inflamación sistémica que altera el metabolismo de los lípidos, la señalización

de la insulina y causan daño al endotelio vascular promoviendo varias etapas de la aterogénesis, como son la disfunción endotelial, así como el inicio, la progresión y la ruptura de la placa aterosclerótica y consecuentemente la enfermedad cardiovascular (Charo and Taubman, 2004; Lau *et al.*, 2005; Tedgui and Mallat, 2006; Beauloye *et al.*, 2007; Aukrust *et al.*, 2008; Ho, 2009).

La lesión temprana visible en el desarrollo de la aterosclerosis es la estría grasa, que es un área de engrosamiento de la íntima compuesta de macrófagos distendidos a través de gotitas de lípidos, linfocitos y células del músculo liso, conocidas como células espumosas. La MCP-1 juega un papel importante en el reclutamiento de monocitos y macrófagos en la lesión vascular, que es una de las etapas tempranas en la aterogénesis. (Raines and Ferri, 2005; Papadopoulou *et al.*, 2008). Los monocitos circulantes se adhieren al endotelio en varias etapas, que incluye el rodamiento mediado por selectinas, el arresto por integrinas, la difusión y la diapédesis. Después de entrar en el espacio subendotelial, los monocitos se diferencian en macrófagos y junto con las células espumosas continúan secretando moléculas bioactivas, tales como factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas como la MCP-1, que pueden reclutar y activar monocitos adicionales (Tedgui and Mallat, 2006; Charo and Taubman, 2004; Girn *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2005).

Las quimiocinas constituyen una familia de proteínas quimioatrayentes, y se subdividen en cuatro familias de acuerdo a la posición relativa de sus residuos cisteína N-terminal, y se denominan CXC, CC, CX3C, y C, de acuerdo con la nomenclatura sistemática (Deshmane *et al.*, 2009; Girn *et al.*, 2007; Charo and Taubman, 2004). La proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1/CCL2) es la primera quimiocina CC humana que se descubrió, fue purificada de una línea celular humana en base a su propiedad quimioatrayente de monocitos. La MCP-1 está formada por 76 aminoácidos, tiene un peso de 13 kDa; su estructura secundaria consiste de cuatro regiones β , que incluyen 9-11 residuos (β_0), 27-31 (β_1), 40-45 (β_2) y 51-54 (β_3), de una región helical de aproximadamente 58 a 69 residuos, y de los residuos 6-16 que están involucrados en la dimerización de la interface de CCL2. La

MCP-1 es una quimiocina que regula la migración e infiltración de monocitos, macrófagos, células T de memoria, basófilos y células natural killer (NK) al sitio de inflamación. Esta quimiocina juega un papel importante en la iniciación y patogénesis de las enfermedades cardiovasculares (Deshmane *et al.*, 2009; Dechkum *et al.*, 2006; Yuasa *et al.*, 2009). La MCP-1 se produce por células endoteliales, del músculo liso, mesangiales, astrocíticas, epiteliales, monocíticas, microgliales, fibroblastos y adipocitos (Deshmane *et al.*, 2009). La expresión de esta proteína es estimulada por TNF α , IL-6 e IL-1 β y es suprimida por IL-10 (Sedlmeier *et al.*, 2007). El aumento en los niveles séricos de MCP-1, se ha asociado a diversas enfermedades crónicas como son enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, DMT2, hipertensión arterial, hiperlipidemia, RI y a enfermedades infecciosas como la tuberculosis y el VIH (Yuasa *et al.*, 2009; Zineh *et al.*, 2009; Mine *et al.*, 2006).

El gen de *MCP-1/CCL2* se encuentra situado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q11.2). Está formado por la región promotora y 3 exones separados por dos intrones. En éste gen se han descrito varios polimorfismos, en la región distal del promotor, localizados a 1.8-2.7 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, los polimorfismos: -2518 A/G, -2507 G/A, -2492 T/G y -927 G/C; en la región proximal del promotor el polimorfismo -299 C/G, y los polimorfismos +964 C/T y +1606 T/C en el exón 2 y 3, respectivamente (Flores-Villanueva *et al.*, 2005; Dechkum *et al.*, 2006; Kouyama *et al.*, 2007).

Los polimorfismos en la región promotora en el gen de *MCP-1* pueden influir sobre la transcripción y por consiguiente afectan los niveles séricos de esta proteína, y se han asociado con el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas e infecciosas, como son obesidad, DMT2, hipertensión, aterosclerosis, y VIH (Gonzalez *et al.*, 2002; Tucci *et al.*, 2004; Gustafson *et al.*, 2007). Dos polimorfismos en la región reguladora distal del gen de *MCP-1*, el -927 G/C y el -2518 A/G, se han relacionado con el grosor de la íntima media de la carótida, que indica una aterosclerosis generalizada y es predictivo de futuros eventos cardiovasculares (Tucci *et al.*, 2004; Brenner *et al.*, 2006; Saenz-Lopez *et al.*, 2008; Deshmane *et al.*, 2009).

El polimorfismo -2518 A/G afecta las concentraciones séricas de MCP-1, no sólo a nivel basal sino también bajo condiciones patológicas como hipertensión, hiperlipidemia, diabetes mellitus, aterosclerosis, artritis reumatoide, esclerosis, tuberculosis y VIH (Dechkum *et al.*, 2006). Gonzalez *et al.*, en el 2002, reportaron que individuos con el alelo -2518G presentan niveles elevados de MCP-1. En otro estudio realizado por Jemaa *et al.*, encontró que el alelo G, se asocia con enfermedad arterial coronaria e infarto al miocardio (Jemaa *et al.*, 2008; Gonzalez *et al.*, 2002). Pero también se han reportado resultados contradictorios por otros investigadores, en un estudio realizado por Kouyama *et al.*, 2007, encontraron que los individuos con el genotipo AA presentan niveles elevado de MCP-1, comparado con los individuos con el genotipo GG, en una población japonesa con obesidad y DMT2 (Kouyama *et al.*, 2007).

También se han realizado estudios donde se demuestra que el alelo -2518G en la región promotora distal de *MCP-1*, incrementa los niveles séricos de la proteína, en comparación con el alelo A, en células estimuladas con citocinas proinflamatorias como la IL-1 β . En un estudio realizado en 2008, Wright Jr *et al.*, propusieron un modelo molecular de la expresión de MCP-1 regulada por el alelo -2518G en astrocitos, que son las principales células productoras de MCP-1 en el cerebro. El análisis molecular preliminar de este estudio sugirió que la región donde se encuentra el polimorfismo -2518 A/G comparte homología con un elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE) y el factor regulador de interferón (IRF) se une con mayor afinidad al alelo A que el alelo G, pero cuando se encuentra el alelo G se crea un sitio de unión consenso para los reguladores transcripcionales Prep1 y Pbx2. Cuando el promotor de MCP-1 presenta el alelo G, y no hay estimulación con IL-1 β , se presenta una baja actividad basal comparada al alelo A, pero cuando se estimula con IL-1 β , el complejo Prep1/Pbx2 mantienen la capacidad de unión al alelo -2518G, y los niveles de transcripción se incrementan, sugiriendo que la región -2518 influye en la transcripción de MCP-1 bajo condiciones proinflamatorias. Por lo tanto, cuando se presenta el alelo G hay una alta inducción y se esperaría que

individuos homocigotos para este alelo presenten fenotipos hipersensibles a MCP-1 durante los períodos de inflamación (Wright Jr *et al.*, 2008).

Se han realizado muy pocos estudios del polimorfismo -927 G/C, pero se considera que este puede afectar la transcripción y expresión de MCP-1, solo Brenner *et al.*, en el 2006, encontraron asociación del alelo -927C con el aumento del grosor de la íntima carótida, en un grupo de pacientes con enfermedad cerebrovascular (Brenner *et al.*, 2006).

Con base en lo anterior, se plateó como objetivo evaluar la relación entre los niveles séricos de MCP-1 con los polimorfismos -2518 A/G y -927 G/C en niños con obesidad. Debido a que en la población Guerrerense no se han estudiado estos polimorfismos, se desconoce su distribución y si hay asociación con los niveles séricos de MCP-1 en niños con obesidad, por lo que es importante la identificación de estos SNPs, lo que permitirá conocer si los niveles séricos de MCP-1 son un marcador de riesgo cardiovascular y los polimorfismos de susceptibilidad en población infantil Guerrerense.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes, de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Se analizaron muestras de suero y de ADN genómico, que fueron obtenidas previamente en un estudio de casos y controles, realizado en 225 niños originarios del estado de Guerrero, que fueron captados en 3 escuelas primarias de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero. Los participantes en el estudio no estuvieron relacionados genéticamente, presentaron de 6 a 13 años de edad, fueron de uno u otro sexo, y se integraron en dos grupos: 106 niños con obesidad y 119 niños con peso normal. Los padres o tutores de los niños que aceptaron la participación de sus hijos en el estudio, firmaron su carta de consentimiento.

Mediciones somatométricas

Se cuenta con una base de datos que incluye todas las mediciones realizadas en un estudio previo. A los niños se les midió su composición corporal para integrar los grupos de estudio. Las medidas que se determinaron fueron peso y talla para obtener su índice de masa corporal (IMC), el peso se midió con la báscula de precisión profesional denominada TANITA IRONMAN™ BC-553, para lo cual el niño(a) estuvo de pie, descalzo y con ropa mínima. La estatura se midió con un estadímetro portátil SECA BM-214, el índice de cintura-cadera (ICC) y la circunferencia del brazo se evaluaron con una cinta antropométrica; los pliegues cutáneos: bicipital, tricipital, subescapular y suprailíaco se midieron con un plicómetro (DYNATRON CE 0120); y la presión arterial sistólica y diastólica con un esfigmomanómetro con brazalete pediátrico (RIESTER CE 0124).

Determinación de los niveles séricos de MCP-1

La MCP-1 se midió en los sueros almacenados a -20 °C de 156 niños en edad escolar. La determinación de las concentraciones de MCP-1 se cuantificó empleando un método de ensayo inmunoenzimático (K-ASSAY® Human MCP-1 ELISA, KAMIYA

BIOMEDICAL COMPANY), utilizando un anticuerpo monoclonal anti-MCP-1. El límite de sensibilidad fue de 2.31 pg/mL.

Determinación de los polimorfismos -2518 A/G y -927 G/C del gen de *MCP-1*

La genotipificación de los polimorfismos -2518 A/G y -927 G/C en el promotor del gen de *MCP-1*, se realizó mediante las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP).

La amplificación de un fragmento que incluyó el SNP -2518 A/G se llevó a cabo utilizando los siguientes iniciadores: sentido 5` GAGTGTTACATAGGCTTCTG 3` y antisentido 5` TCTCTCACGCCAGCACTGACC 3`. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, adicionando buffer 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.2 µM de cada primer, *Taq* polimerasa 2.0 U (Invitrogen) y 100 ng de ADN genómico. La amplificación se realizó en un termociclador (Techne TC-412); bajo las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguidos de 25 ciclos para la amplificación: desnaturalización a 94 °C por 30 seg, alineamiento a 63 °C por 30 seg, extensión a 72 °C por 30 seg, y una extensión final a 72 °C por 5 min. El producto amplificado de 234 pb, fue digerido con la enzima de restricción *PvuII* (New England BioLabs, Beverly, MA, USA), que reconoce una secuencia específica 5`...CAG[^]CTG... 3`. La mezcla de reacción consistió de 5 U de enzima, 1 µL de buffer de reacción y 8 µL de producto de PCR, la mezcla se incubó a 37 °C por 2 horas. La identificación de los genotipos se realizó mediante el siguiente patrón de restricción: un fragmento para el homocigoto A/A (234 pb); tres fragmentos para el heterocigoto A/G (234 pb, 159 pb, 75 pb); y dos fragmentos para el homocigoto G/G (159 pb, 75 pb).

Para la amplificación de un fragmento que incluyó el SNP -927 G/C se utilizaron los siguientes iniciadores: sentido 5` CAGCCCTGTCCCCAGTGGGCTGCCACC 3` y antisentido 5` TGCTGAGGACAGAGAGAGGACCCGA 3`. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, adicionando buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.2 µM de cada primer, *Taq* polimerasa 2.0 U (Invitrogen) y 100 ng de ADN

genómico. La amplificación se realizó en un termociclador (Techne TC-412); bajo las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguidos de 30 ciclos para la amplificación: desnaturalización a 94 °C por 30 seg, alineamiento a 68 °C por 30 seg, extensión a 72 °C por 30 seg, y una extensión final a 72 °C por 3 min. El producto amplificado de 107 pb, fue digerido con la enzima de restricción *Bsp1286I* (New England BioLabs, Beverly, MA, USA), la cual reconoce la secuencia específica 5'...GDGCH^AC... 3'. La mezcla de reacción consistió de 5 U de enzima, 1 µL de buffer de reacción y 2 µL de producto de PCR, la mezcla se incubó a 37 °C por 2 horas. La identificación de los genotipos se realizó mediante el siguiente patrón de restricción: un fragmento para el homocigoto G/G (107 pb); tres fragmentos para el heterocigoto G/C (107 pb, 83 pb, 24 pb); y dos fragmentos para el homocigoto C/C (83 pb, 24 pb).

El análisis de los productos de PCR así como de los productos de digestión se llevó a cabo por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y para la visualización de los productos se utilizó una tinción con nitrato de plata al 0.2% (Figura 1 y 2).

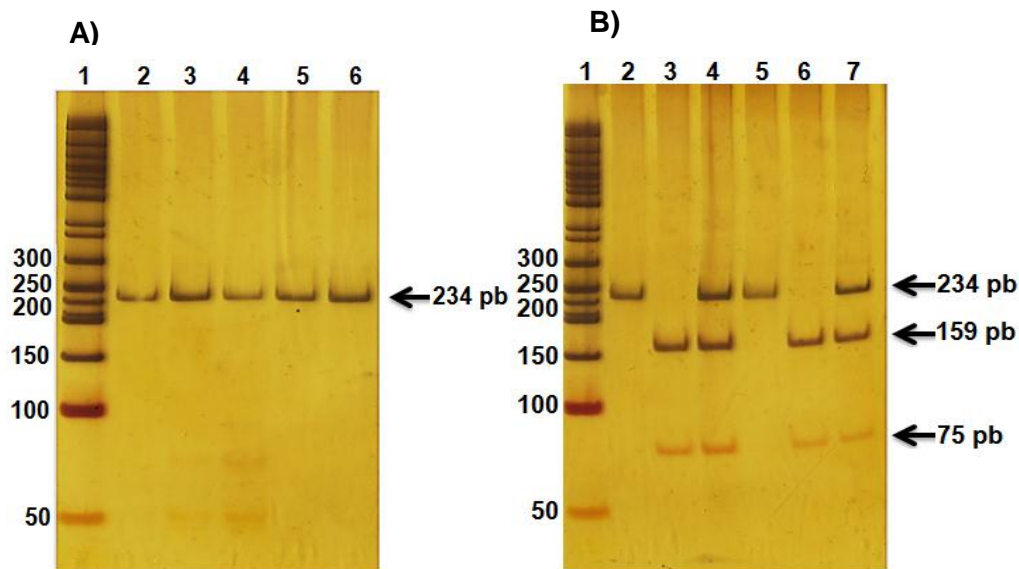


Figura 1. Identificación del polimorfismo -2518 A/G en el gen de *MCP-1* en geles de poliacrilamida al 6%. **A)** Carril 1. Marcador de peso molecular de 50 pb, carriles 2-6 productos de PCR de 234 pb. **B)** Identificación de los genotipos después de la digestión con la enzima *PvuII*. Carril 1: Marcador de peso molecular de 50 pb, carriles 2 y 5: genotipo AA, carriles 3 y 6: genotipo GG y carriles 4 y 7: genotipo AG.

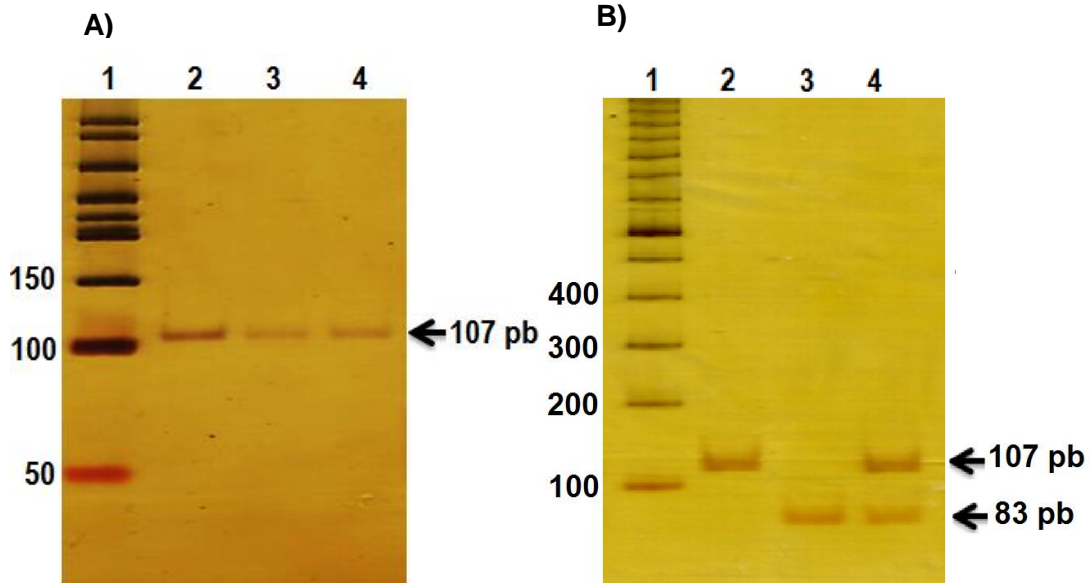


Figura 2. Identificación del polimorfismo -927 G/C en el gen de *MCP-1* en geles de poliacrilamida al 6%. Carril 1. A) Carril 1: Marcador de peso molecular de 50 pb, carriles 2-4: productos de PCR de 107 pb. B) Identificación de los genotipos después de la digestión con la enzima *Bsp1286I*. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2: genotipo GG, carril 3: genotipo CC y carril 4: genotipo GC.

Análisis estadístico

Se obtuvieron medias y desviaciones estándar de las variables cuantitativas simétricas y la comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de *t* Student; y para las variables cuantitativas no simétricas se obtuvieron medianas y percentil 5 y 95 y la comparación entre los grupos se realizó mediante la prueba de Mann Whitney. Se determinaron las frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas y para la comparación de estas se usó la prueba estadística de Ji cuadrada (χ^2). Las frecuencias genotípicas y alélicas para los polimorfismos en estudio se realizaron por conteo directo y se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg. En la valoración de la correlación entre las concentraciones de MCP-1 con algunas variables somatométricas y clínicas se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. Para evaluar la asociación entre los niveles séricos de MCP-1 con los polimorfismos en estudio, así como de otras variables de exposición, se realizaron modelos de regresión lineal. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico STATA v.9.2.

RESULTADOS

El presente estudio incluyó a 225 niños, de los cuales el 52% fueron hombres y el 48% mujeres, en edad escolar de 6 a 13 años, originarios del estado de Guerrero. Se clasificaron en dos grupos de acuerdo a su IMC, el grupo de peso normal conformado por 119 niños y el grupo con obesidad con 106 niños.

En los niños con obesidad se encontraron incrementadas todas las medidas de adiposidad central y subcutánea, y de las presiones arteriales sistólica y diastólica en comparación con los de peso normal. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la edad y género. Se encontró una mayor prevalencia de hipertensión en el grupo de niños con obesidad (14.15%) en comparación con los de peso normal (1.68%). El grupo con obesidad también presentó un incremento en los niveles séricos de la hsCRP y en el número de leucocitos y plaquetas (tabla 1).

Tabla 1. Características sociodemográficas y clínicas de los grupos estudiados.

Variables	Total (n=225)	Normo peso (n=119)	Obesidad (n=106)	Valor p
Edad (años) ^c	9(6-11)	9(6-12)	9(6-11)	0.70
Sexo n(%) ^a				0.19
Masculino	117(52)	57(47.9)	60(56.6)	
Femenino	108(48)	62(52.1)	46(43.4)	
Peso (kg) ^c	33.2(20.1-59.1)	27.8(19.2-39.9)	42.55(27.4-63.9)	<0.001
Talla (cm) ^b	132.63±11.25	130.11±10.58	135.47±11.35	<0.001
IMC (kg/m ²) ^c	18.4(14.3-27)	16.3(13.9-19.08)	23.1(18.8-29.1)	<0.001
Circunferencia de cintura (cm) ^c	67(54-88)	62(52-73)	79(64.5-94)	<0.001
Circunferencia de cadera (cm) ^c	75(62-96)	70(61-82)	84(69.5-99)	<0.001
Índice cintura-cadera ^c	0.9(0.8-0.97)	0.87(0.8-0.96)	0.9(0.8-1.0)	<0.001
Circunferencia de brazo (cm) ^c	21(16-28)	19(15-22)	24.5(20.5-30.5)	<0.001
Pliegue bicipital (mm) ^b	15.52±4.85	13.25±4.27	18.08±4.16	<0.001
Pliegue tricipital (mm) ^c	15(8.5-21.5)	12(8-18)	18(11.5-22)	<0.001
Pliegue subescapular (mm) ^c	13(6-22)	10(5-18)	18(11.5-24.5)	<0.001
Pliegue suprailiaco (mm) ^b	17.93±5.53	15.09±4.54	21.13±4.76	<0.001
PAS (mmHg) ^c	98(81-115)	90(80-108)	101(90-123)	<0.001
PAD (mmHg) ^c	58(48-71)	54(45-61)	60(50-77)	<0.001
Hipertensión arterial n(%) ^a				<0.001
No	208(92.44)	117(98.32)	91(85.85)	
Si	17(7.56)	2(1.68)	15(14.15)	
hsCRP (mg/L) ^c	0.8(0.1-6.5)	0.41(0.1-6.1)	1.48(0.2-8.4)	<0.001
Leucocitos (10 ³ /mm ³) ^c	7.7(5-12.3)	7(4.7-12.3)	8.1(5.8-12.7)	<0.001
Plaquetas (10 ³ /mm ³) ^c	308(219-413)	302(202-410)	319(235-415)	0.02

^a Datos proporcionados en n y porcentajes. Prueba de ji cuadrada. ^b Datos proporcionados en medias ± DE. Prueba t de Student. ^c Datos proporcionados en medianas (p5-p95). Prueba de Mann-Whitney. IMC: Índice de masa corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica.

Al comparar por grupo los niveles de MCP-1, se observó un aumento significativo en los niños con obesidad en comparación con los de peso normal (391.02 vs. 351.07 pg/mL, $p=0.04$, respectivamente). También se realizó la comparación por género y se observó que los hombres presentaron niveles más altos de MCP-1 con respecto a las mujeres, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (figura 3).

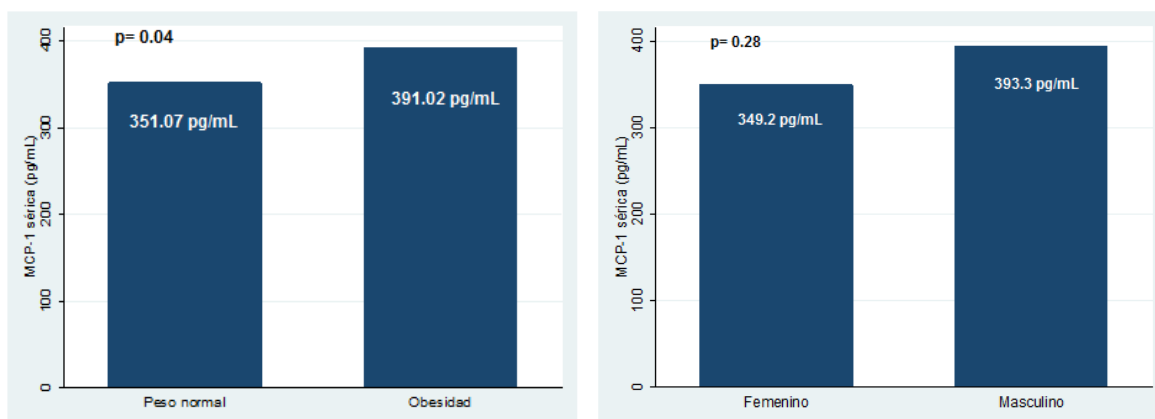


Figura 3. Concentraciones de la MCP-1 por grupo y por género.

En la tabla 2, se muestra la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas, de los polimorfismos -2518 A/G y -927 G/C en el gen de la *MCP-1* de los grupos estudiados. Para el polimorfismo -2518 A/G no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas ($p=0.82$) ni alélicas ($p=0.98$) entre los dos grupos; donde el genotipo más frecuente fue el heterocigoto GC (47%), seguido del homocigoto GG (37%). En cuanto al polimorfismo -927 G/C tampoco se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas ($p=0.39$) ni alélicas ($p=0.81$) entre los grupos; el genotipo más frecuente fue el homocigoto GG (77%) seguido del heterocigoto GC (22%). Ambos polimorfismos se encontraron en equilibrio de Hardy Weinberg, $X^2= 0.034$, $p=0.85$ para el polimorfismo -2518 A/G, y $X^2= 0.030$, $p= 0.68$ para el polimorfismo -927 G/C.

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos -2518 A/G y -927 G/C en el gen de la *MCP-1* en los grupos estudiados.

SNP -2518 A/G	Total (n=220)	Normo peso (n=117)	Obesidad (n=103)	Valor p*
Genotipos n(%)				0.82
AA	36 (16)	18 (15.3)	18(17.4)	
AG	103 (47)	57 (48.7)	46 (44.7)	
GG	81 (37)	42 (36)	39 (37.9)	
Alelos n(%)				0.98
A	175(40)	93(40)	82(40)	
G	265(60)	141(60)	124(60)	
SNP -927 G/C	Total (n=220)	Normo peso (n=117)	Obesidad (n=103)	Valor p*
Genotipos n(%)				0.39°
GG	169 (77)	90 (77)	79 (77)	
GC	49 (22)	25 (21)	24 (23)	
CC	2 (1.0)	2 (2)	0 (0.0)	
Alelos n(%)				0.81
G	387(88)	205(88)	182(88)	
C	53(12)	29(12)	24(12)	

*Prueba de X².

°X² con prueba exacta de Fischer.

La comparación de las variables clínicas y de inflamación de acuerdo con los genotipos del polimorfismo -2518 A/G en el gen de la *MCP-1*, se realizó mediante un modelo genético dominante y no se encontraron diferencias significativas entre los portadores de los genotipo AA+AG vs. GG, en todos los niños estudiados (tabla 3).

Tabla 3. Características generales por genotipos AA+AG y GG del polimorfismo -2518 A/G en el gen de la MCP-1 en la población estudiada.

Variables	Total (n=220)	AA+AG (n=139)	GG (n=81)	Valor p
Edad (años) ^c	9(6-11)	9(6-11)	9(6-12)	0.22
Sexo n(%) ^a				0.26
Masculino	114(51.8)	68(48.9)	46(56.8)	
Femenino	106(48.2)	71(51.1)	35(43.2)	
Peso (kg) ^c	33.1(20.1-59.1)	31.1(20-59.1)	34.8(20.1-59.7)	0.11
Talla (cm) ^b	132.6±11.3	131.8±11.0	133.8±11.8	0.21
IMC (kg/m ²) ^c	18.4(14.3-27.3)	18.2(14.1-25.9)	18.8(14.8-28.2)	0.10
Circunferencia de cintura (cm) ^c	67(54-88.5)	67(53-87)	67(57-90)	0.17
Circunferencia de cadera (cm) ^c	75(62-96)	74(62-96)	77(63-96)	0.15
Índice cintura-cadera ^c	0.9(0.8-0.97)	0.9(0.8-0.98)	0.9(0.8-0.97)	0.63
Circunferencia de brazo (cm) ^c	21(16-28)	21(16-28)	21(16-29)	0.25
Pliegue bicipital (mm) ^b	15.5±4.9	15.6±5.3	15.4±4.2	0.83
Pliegue tricipital (mm) ^c	15(8.5-21.5)	14.5(8.5-21.5)	15(8-21.5)	0.80
Pliegue subescapular (mm) ^c	13(6-22)	13(5.5-22)	13(6-23)	0.86
Pliegue suprailiaco (mm) ^b	18.0±5.6	17.9±5.5	18.1±5.7	0.82
PAS (mmHg) ^c	98(80.5-115)	98(80-117)	97(81-110)	0.89
PAD (mmHg) ^c	58(48-70.5)	58(48-72)	59(50-70)	0.33
Hipertensión arterial n(%) ^a				0.63
No	204(92.7)	128(92)	76(94)	
Si	16(7.3)	11(8)	5(6)	
hsCRP (mg/L) ^c	0.8(0.1-6.5)	0.8(0.1-7.8)	0.9(0.1-6.3)	0.81
Leucocitos (10 ³ /mm ³) ^c	7.7(5-12.3)	7.7(5-12.9)	7.6(5.3-11.2)	0.83
Plaquetas (10 ³ /mm ³) ^c	308(218.5-414)	308(222-413)	308(205-420)	0.81

^a Datos proporcionados en *n* y porcentajes. Prueba de ji cuadrada. ^b Datos proporcionados en medias ± DE. Prueba *t* de Student. ^c Datos proporcionados en medianas (p5-p95). Prueba de Mann-Whitney. IMC: Índice de masa corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica.

Los portadores del genotipo AA presentaron un ligero incremento en los niveles de MCP-1 (380.5 vs. 361.5, 355.2 pg/mL, *p*=0.88), con respecto a los portadores de los genotipos AG y GG respectivamente, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (figura 4).

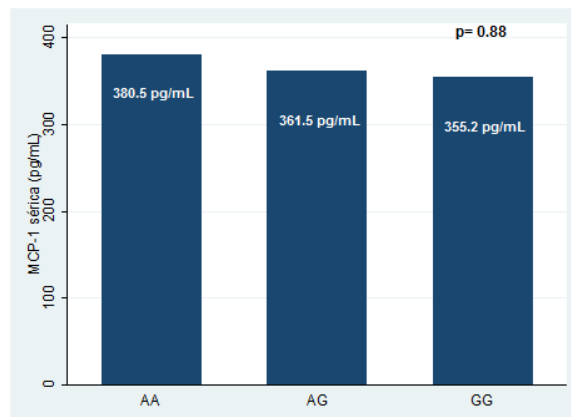


Figura 4. Concentraciones de MCP-1 por genotipos del polimorfismo -2518 A/G.

Para el polimorfismo -927 G/C se compararon las características generales, clínicas y de inflamación por genotipos agrupados utilizando un modelo genético recesivo, en todos los niños estudiados, no se encontraron diferencias entre los portadores de los genotipos GG vs. GC+CC (tabla 4).

Tabla 4. Características generales por genotipos GG y GC+CC del polimorfismo -927 G/C en el gen de MCP-1 en la población estudiada.

Variables	Total (n=220)	GG (n=169)	GC+CC (n=51)	Valor p
Edad (años) ^c	9(6-11)	9(6-11)	9(6-11)	0.43
Sexo n(%) ^a				0.89
Masculino	114(51.8)	88(52)	26(51)	
Femenino	106(48.2)	81(48)	25(49)	
Peso (kg) ^c	33.1(20.1-59.1)	33.2(19.7-59.2)	32(20.4-55.4)	0.50
Talla (cm) ^b	132.6±11.3	132.6±11.8	132.4±9.7	0.91
IMC (kg/m ²) ^c	18.4(14.3-27.3)	18.4(14.4-27.5)	19(14.1-25.9)	0.34
Circunferencia de cintura (cm) ^c	67(54-88.5)	67(54-89)	69(55-87)	0.86
Circunferencia de cadera (cm) ^c	75(62-96)	75(62-96)	76(63-95)	0.81
Índice cintura-cadera ^c	0.9(0.8-0.97)	0.9(0.8-0.97)	0.9(0.8-0.98)	0.88
Circunferencia de brazo (cm) ^c	21(16-28)	21(16-28)	21(16.5-27)	0.76
Pliegue bicipital (mm) ^b	15.5±4.9	15.3±4.8	16.3±5.3	0.21
Pliegue tricipital (mm) ^c	15(8.5-21.5)	14.5(9-21.5)	15(8.5-21)	0.56
Pliegue subescapular (mm) ^c	13(6-22)	13(6-22.5)	12.5(5-21.5)	0.83
Pliegue suprailiaco (mm) ^b	18.0±5.6	18±5.6	18±5.6	0.97
PAS (mmHg) ^c	98(80.5-115)	98(80-115)	97(82-112)	0.55
PAD (mmHg) ^c	58(48-70.5)	58(49-71)	58(48-70)	0.55
Hipertensión arterial n(%) ^a				0.66
No	204(92.7)	156(92)	48(94)	
Si	16(7.3)	13(8)	3(6)	
hsCRP (mg/L) ^c	0.8(0.1-6.5)	0.8(0.1-6.3)	0.8(0.1-8.3)	0.82
Leucocitos (10 ³ /mm ³) ^c	7.7(5-12.3)	7.7(5-12.3)	7.4(5-11.5)	0.12
Plaquetas (10 ³ /mm ³) ^c	308(218.5-414)	308(218-415)	315(219-406)	0.29

^a Datos proporcionados en n y porcentajes. Prueba de ji cuadrada. ^b Datos proporcionados en medias ± DE. Prueba t de Student. ^c Datos proporcionados en medianas (p5-p95). Prueba de Mann-Whitney. IMC: Índice de masa corporal; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica.

Los portadores del genotipo GC presentaron un ligero incremento en los niveles de MCP-1 (409.9 vs. 358.4, 307.2 pg/mL, p=0.17) con respecto a los portadores de los genotipos GG y CC, respectivamente (figura 5).

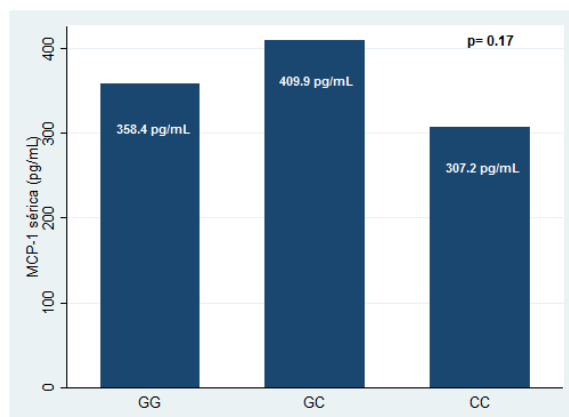


Figura 5. Concentraciones de MCP-1 por genotipos del polimorfismo -927 G/C.

Se realizó el análisis de correlación entre las concentraciones séricas de MCP-1 con pliegues cutáneos, circunferencias de cintura y cadera y marcadores de inflamación, en el que sólo se observó una correlación con el índice de masa corporal ($r=0.17$, $p=0.04$). Además de que se encontraron correlacionados los niveles de MCP-1 con insulina ($r=0.17$, $p=0.05$) y HOMA ($r=0.17$, $p=0.05$) (Datos no mostrados).

Se realizó un análisis de regresión lineal para evaluar el efecto de las medidas de adiposidad que influyen sobre los niveles de MCP-1, encontrándose asociación con IMC ($\beta_1= 6.4$, IC95% 1.5-11.3, R^2 0.03, $p=0.01$), circunferencia de cintura ($\beta_1=2.3$, IC95% 0.5-4.1, R^2 0.03, $p=0.01$), circunferencia de cadera ($\beta_1=2.2$, IC95% 0.3-4.1, R^2 0.02, $p=0.02$), circunferencia de brazo ($\beta_1= 5.4$, IC95% 0.2-10.6, R^2 0.02, $p=0.04$), insulina ($\beta_1= 3.2$, IC95% 0.07-6.3, R^2 0.02, $p=0.04$) e índice HOMA ($\beta_1= 14.2$, IC95% 3.1-25.4, R^2 0.03, $p=0.01$) (tabla 5).

Tabla 5. Efecto de las variables estudiadas sobre los niveles de MCP-1.

Variable	β (IC 95%)	R^2	Valor p
IMC (kg/m^2)	6.4 (1.5-11.3)	0.03	0.01
Circunferencia de cintura (cm)	2.3 (0.5-4.1)	0.03	0.01
Circunferencia de cadera (cm)	2.2 (0.3-4.1)	0.02	0.02
Circunferencia de brazo (cm)	5.4 (0.2-10.6)	0.02	0.04
Insulina ($\mu\text{U/mL}$)	3.2 (0.07-6.3)	0.02	0.04
HOMA	14.2 (3.1-25.4)	0.03	0.01

β = Coeficiente de regresión (ecuación de estimación generalizada);
IC95%; intervalo de confianza del 95%.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la asociación entre los niveles séricos de la MCP-1 con los polimorfismos -2518 A/G y -927 G/C en su gen, en una población de niños escolares con y sin obesidad.

Similar a otros estudios, se encontró que los niños con obesidad presentan un incremento en todas las medidas de la composición corporal, presión arterial y parámetros inflamatorios, con respecto a los de normo peso (Pinto *et al.*, 2007; Freedman *et al.*, 2009). Los niños con obesidad también presentaron concentraciones séricas de MCP-1 significativamente más altas. Estos resultados coinciden con el reporte en una población coreana en adultos con obesidad, donde se observó que las concentraciones de la MCP-1 fueron mayores en individuos con obesidad (183.3 ± 112.1 pg/mL) en comparación con los de peso normal (119.8 ± 28.3 pg/mL) (Kim *et al.*, 2006). En otro estudio realizado en población adulta en el 2007 por Kouyama *et al.*, las concentraciones séricas de la MCP-1 se encontraron incrementadas en los sujetos obesos con DMT2 (317.4 ± 111.7 pg/mL), comparado con los sujetos que solo presentaron DMT2 (302.7 ± 102.4 pg/mL) (Kouyama *et al.*, 2007). Estudios previos en modelos animales y humanos han mostrado que la MCP-1 es secretada por adipocitos y tejido adiposo, y sus niveles, se ven incrementados con el aumento de la masa grasa en sujetos obesos. Debido a que esta quimiocina regula el reclutamiento de macrófagos al tejido adiposo puede alterar la expresión de citocinas proinflamatorias perpetuando un estado de inflamación crónica de bajo grado característica de la obesidad. Se ha sugerido que la obesidad puede estar relacionada con el desarrollo de la aterosclerosis, por lo tanto, a mayor grado de inflamación, mayor producción de la MCP-1, y mayor reclutamiento de monocitos, lo que favorece el daño al endotelio vascular (Kim *et al.*, 2006).

Se compararon los niveles de la MCP-1 por género y edad, y se encontraron niveles ligeramente aumentados en los niños con respecto a las niñas, en cuanto a la edad no se observaron diferencias en los niveles de MCP-1. Nuestros resultados son

similares a lo reportado en un estudio previo realizado en niños obesos hispanos, y encontraron que los niveles séricos de MCP-1 fueron de 317 ± 117 pg/mL en niños y de 309 ± 117 pg/mL en niñas (Cai *et al.*, 2008). En adultos se ha encontrado que la edad y género pueden influir sobre los niveles de MCP-1; en un estudio realizado por Berrahmoune *et al.*, 2006, reportaron que los hombres presentaron niveles séricos de MCP-1 más altos (95.7 ng/L) en comparación con las mujeres (77.5 ng/L) ($p \leq 0.001$), además que los niveles de MCP-1 aumentan significativamente con la edad (Berrahmoune *et al.*, 2006).

Al analizar la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo -2518 A/G en el gen de *MCP-1*, en nuestra población, se encontró con mayor frecuencia el heterocigoto AG (47%), siendo el alelo G (60%) el más frecuente. Estos resultados son similares a los reportados en un estudio previo realizado en población adulta de mestizos mexicanos por Vázquez-Lavista *et al.*, en el 2009, que encontraron frecuencias de 56.35% y 57.54% para el genotipo heterocigoto AG y el alelo G, respectivamente. Similarmente en un estudio realizado en población japonesa encontraron con más frecuencia el alelo G (Kouyama *et al.*, 2007). Sin embargo, se observaron diferencias con respecto a las frecuencias reportadas en otros estudios; como en los realizados en población adulta tunecina (Jemaa *et al.*, 2008), en población turca (Cam *et al.*, 2008) y en población estadounidense (Tucci *et al.*, 2004), en las que se encontró una mayor frecuencia del alelo A. Lo que sugiere que el alelo G es más frecuente en individuos mexicanos y asiáticos comparado con caucásicos (Rovin *et al.*, 1999). Estas diferencias en los resultados puede atribuirse a la influencia racial entre poblaciones que tienen un origen étnico diferente, ya que la población mexicana es considerada una población mestiza que fue originada a partir de la mezcla de genes españoles, africanos, asiáticos y amerindios, por lo cual presentamos una mayor diversidad genética, lo que de alguna manera explica las similitudes y diferencias genotípicas y alélicas en nuestra población con respecto a otras poblaciones del mundo (Vázquez-Lavista *et al.*, 2009), así como también se puede atribuir a los criterios de inclusión y tamaño de la muestra de cada estudio.

En cuanto a la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -927 G/C en el gen de *MCP-1* encontradas en este estudio, son las primeras reportadas en nuestro país, donde el alelo G presenta una frecuencia de 88% y el alelo C de 12%, siendo frecuencias similares a las reportadas en un estudio realizado en población adulta alemana por Sedlmeier *et al.*, 2007, que encontraron una frecuencia de 78% para el alelo G y 22% para el alelo C. Resultados similares se observaron en población francesa donde el alelo G fue el más frecuente (Brenner *et al.*, 2006).

Al comparar los genotipos obtenidos de los polimorfismos -2518 A/G y -927 G/C con las variables generales, clínicas y de inflamación no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo en un estudio previo realizado para el polimorfismo -927 G/C encontraron diferencias por genotipos en los niveles de glucosa en ayuno ($p=0.033$) y la talla ($p=0.0024$) (Sedlmeier *et al.*, 2007). En otro estudio realizado en población francesa para los polimorfismos -927 G/C y -2518 A/G, para el caso del -927 G/C encontraron que los portadores del genotipo CC tuvieron un incremento en la íntima media carótida ($p=0.002$), y para el -2518 A/G observaron que los portadores del genotipo homocigotos GG tuvieron una media más baja del grosor de la íntima media carótida comparado con los portadores del genotipo AA ($p=0.009$) (Brenner *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Jemaa *et al.*, en el 2008, en población tunecina, encontraron que los portadores de los genotipos AG y GG tienen 1.51 y 2.80 veces más susceptibilidad de desarrollar hipertensión que los portadores del genotipo AA, respectivamente.

Cuando se compararon los niveles séricos de *MCP-1* con los genotipos obtenidos para ambos polimorfismos se encontró un leve incremento en los portadores de los genotipos -2518AA y -927GC. Estos resultados coinciden con lo reportado en un estudio realizado en Japón en una población adulta de obesos con DMT2, donde los portadores del genotipo -2518AA tuvieron altas concentraciones séricas de *MCP-1* (396 ± 118 vs. 305 ± 107 pg/mL, $p=0.045$) con respecto a los portadores de los genotipos GG+AG, respectivamente (Kouyama *et al.*, 2007). Lo que puede sugerir que el genotipo -2518AA y con una tendencia el genotipo -927GG pueden favorecer

el incremento de las concentraciones séricas de MCP-1 en la población estudiada. También fue consistente con otro estudio previo donde reportan que el alelo -2518A se asocia con altas concentraciones de MCP-1 en Caucásicos (Simeoni *et al.*, 2004). En contraste, en modelos murinos, se ha reportado que el alelo -2518G está asociado con un incremento en la producción de MCP-1. En un estudio *in vitro* Rovin *et al.*, observaron que la actividad de la luciferasa inducida por la IL-1 β fue significativamente mayor en células transfectadas con las construcciones que tenían el genotipo heterocigoto AG en la posición -2518 que en aquellas que tenían el genotipo AA. También observaron que las células mononucleadas de sangre periférica obtenidas de individuos portadores del alelo G, y tratadas con IL-1 β produjeron más MCP-1 que las células de individuos homocigotos para AA (Rovin *et al.*, 1999). El mecanismo molecular por el cual los polimorfismos regulan la transcripción del gen *MCP-1* no es claro. Se sabe que el polimorfismo -2518 A/G está localizado en la región reguladora distal del gen, y se ha reportado que dos elementos pueden ser importantes para la transcripción del gen *MCP-1*, el primero es un sitio de unión a NF- κ B localizado río arriba entre -2612 y -2603 pb, esencial para la transcripción del gen estimulado por citocinas como IL-1 β y TNF- α , y el segundo una caja GC localizada entre -64 y -59 pb importante para mantener la actividad transcripcional basal del gen. El polimorfismo -2518 A/G no altera la secuencia del sitio NF- κ B, pero se ha sugerido que puede alterar un sitio de unión a un factor de transcripción no identificado, y que éste SNP puede estar en desequilibrio de ligamiento (DL) con otras variantes génicas como -299 C/G, +964 C/T y +1606 T/C. Es posible que haya otras variaciones genéticas en la región reguladora del gen *MCP-1* que contribuyen a las diferencias en la tasa transcripcional de MCP-1 (Uedad *et al.*, 1994; Rovin *et al.*, 1999; Kouyama *et al.*, 2007).

En este estudio, se observó una correlación de las concentraciones séricas de MCP-1 con IMC ($r=0.17$, $p=0.04$), pero no con los marcadores de inflamación como CRP, leucocitos y plaquetas. Como lo reportan en un estudio realizado en población adulta de Corea con obesidad, donde encontraron correlaciones entre MCP-1 e IMC ($r=0.230$, $p<0.02$), la circunferencia de cintura ($r=0.278$, $p<0.009$), y CRP ($r=0.516$, $p<0.007$) (Kim *et al.*, 2006). En otro estudio Harsiman *et al.*, observaron una

correlación entre MCP-1 e IMC ($r= 0.17$, $p<0.01$) (Harsiman *et al.*, 2009). Utilizando un modelo de regresión lineal en este estudio, se encontró una asociación entre MCP-1 con IMC ($\beta_1= 6.4$, $R^2 0.03$, $p=0.01$), circunferencia de cintura ($\beta_1=2.3$, $R^2 0.03$, $p=0.01$), circunferencia de cadera ($\beta_1=2.2$, $R^2 0.02$, $p=0.02$) y circunferencia de brazo ($\beta_1= 5.4$, $R^2 0.02$, $p=0.04$), donde el 3% de la variabilidad en los niveles séricos de MCP-1 se explica por el incremento en el IMC y circunferencia de cintura y el 2 % por el incremento en circunferencia de cadera y de brazo. Lo que puede sugerir que el aumento en los niveles circulantes de MCP-1 está relacionado con la circunferencia de cintura, apoyando la idea de que la grasa visceral juega un papel importante en el aumento de los niveles de MCP-1 en la obesidad.

Se considera que la inflamación crónica de grado bajo en la obesidad, es un mecanismo que juega un papel importante sobre los niveles de MCP-1. La concentraciones de CRP se han encontrado más altas en niños obesos que en delgados, e *in vitro* se observó que CRP induce la expresión de quimiocinas como la MCP-1 en células endoteliales humanas, por lo tanto la elevación de los niveles de MCP-1 en obesidad pueden estar influenciada por la CRP. Además puede indicar que el tejido adiposo es una fuente común tanto de la MCP-1, así como de citocinas que regulan la producción hepática de CRP y puede explicar en parte el incremento en los niveles circulantes de la MCP-1 y CRP que se da igualmente en la obesidad (Mangge *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Soriano-Guillén *et al.*, 2008).

Cómo un hallazgo de este estudio se encontró correlación entre MCP-1 e insulina ($r=0.17$, $p=0.05$) y HOMA ($r=0.17$, $p=0.05$), estos resultados son similares a los reportados por Kouyama *et al.*, donde reportan una correlación entre MCP-1 y HOMA ($r=0.300$, $p=0.002$) (Kouyama *et al.*, 2007). Utilizando un modelo de regresión lineal, se observó asociación entre la MCP-1 con insulina ($\beta_1= 3.2$, $R^2 0.02$, $p=0.04$) y HOMA ($\beta_1= 14.2$, $R^2 0.03$, $p=0.01$). En varios estudios se ha demostrado que el tejido adiposo puede impactar sobre los niveles de MCP-1, de manera importante el tejido adiposo visceral (Malavazos *et al.*, 2005; Bruun *et al.*, 2005), también se conoce que otros factores pueden influir sobre los niveles de esta proteína, en un estudio

observaron que la insulina induce la expresión y secreción de MCP-1 *in vitro* en adipocitos 3T3-L1 resistentes a la insulina, e *in vivo* en ratones obesos resistentes a la insulina, por lo tanto el gen de *MCP-1* fue identificado como un gen de respuesta a insulina. La hiperinsulinemia que frecuentemente acompaña a la obesidad y RI puede por lo tanto contribuir a la expresión alterada del gen de *MCP-1* y otros genes en tejidos blancos para la insulina (Sartipy and Loskutoff, 2003).

Otro mecanismo aparte de la inflamación que regula los niveles de MCP-1 de manera importante es la insulina, que ejerce efectos sobre la secreción de MCP-1, esta interacción puede ser importante para el desarrollo de RI en niños. En este estudio los niños obesos presentaron niveles más altos de MCP-1, y se ha observado que el tejido adiposo de sujetos obesos se caracteriza por una gran infiltración de macrófagos, que es un evento temprano que contribuye al desarrollo de RI, y en ratones transgénicos que sobre expresan MCP-1 en adipocitos desarrollan inflamación del tejido adiposo y RI sin obesidad (Sell *et al.*, 2006; Tateya *et al.*, 2010). Por lo tanto, hipotetizamos que la MCP-1 puede ser un marcador de inflamación y de RI.

CONCLUSIONES

Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo -2518 A/G en el gen de *MCP-1* fueron: AA (15.3%), AG (48.7%), y GG (36%) y para el polimorfismo -927 G/C fueron: GG (77%), GC (21%) y CC (2%) en los niños con peso normal.

Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo -2518 A/G en el gen de *MCP-1* fueron: AA (17.4%), AG (44.7%), y GG (37.9%) y para el polimorfismo -927 G/C fueron: GG (77%), GC (23%) y CC (0%) en los niños con obesidad.

Los niños (as) con obesidad presentaron concentraciones séricas más altas de MCP-1 en comparación con los de peso normal, y por género los niños con y sin obesidad presentan un incremento en los niveles séricos de MCP-1 con respecto a las niñas.

Los niveles séricos de MCP-1 no se encontraron relacionados con los polimorfismos -2518 A/G y -927G/C en su gen.

Los niveles séricos de MCP-1 se asociaron con IMC, circunferencia de cintura, circunferencia de cadera, circunferencia de brazo, insulina y HOMA.

REFERENCIAS

- ALVES S, BELTRÁN J, MONDINI L, MARTINS I. (2006). Prevalence of overweight and obesity, and associated factors in school children from urban area in Chilpancingo, Guerrero, México, 2004. *Cad Saúde Pública*, 22 (6): 1289-1301.
- AUKRUST, P., HALVORSEN, B., YNDESTAD, A., UELAND, T., OIE, E., OTTERDAL, K., *et al.* (2008). Chemokines and cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28 (11), 1909-1919.
- BEAULOYE, V., ZECH, F., TRAN, H. T., CLAPUYT, P., MAES, M. & BRICHARD, S. M. (2007). Determinants of early atherosclerosis in obese children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(8), 3025-3032.
- BERRAHMOUNE, H., LAMONT, J. V., HERBETH, B., FITZGERALD, P. S. & VISVIKIS-SIEST, S. (2006). Biological Determinants of and Reference Values for Plasma Interleukin-8, Monocyte Chemoattractant Protein-1, Epidermal Growth Factor, and Vascular Endothelial Growth Factor: Results from the STANISLAS Cohort. *Clin. Chem.*, 52(3), 504-510.
- BRENNER, D., LABREUCHE, J., TOUBOUL, P. J., SCHMIDT-PETERSEN, K., POIRIER, O., PERRET, C., *et al.* (2006). Cytokine polymorphisms associated with carotid intima-media thickness in stroke patients. *Stroke*, 37(7), 1691-1696.
- BRUUN, J. M., LIHN, A. S., PEDERSEN, S. B. & RICHELSEN B. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): Implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol and Metab*, 90(4), 2282–2289.
- CAI, G., COLE, S. A., BUTTE, N. F., SMITH, C. W., MEHTA, N. R., VORUGANTI, V. S., *et al.* (2008). A genetic contribution to circulating cytokines and obesity in children. *Cytokine*, 44(2), 242-247.
- CAM, S. F., SEKURI, C., SAGCAN, A., ERCAN, E., TENGIZ, I., ALIOGLU, E., *et al.* (2008). Effect of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene polymorphism in Turkish patients with premature coronary artery disease. *Escan J Clin Lab Inv*, 68(8), 801-805.
- CHARO, I. F. & TAUBMAN, M. B. (2004). Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*, 95(9), 858-866.
- CHEN, F. L., YANG, Z. H., WANG, X. C., LIU, Y., YANG, Y. H., LI, L. X., *et al.* (2009). Adipophilin affects the expression of TNF-alpha, MCP-1, and IL-6 in THP-1 macrophages. *Mol Cell Biochem*, 337(1-2), 193-199.
- CHEW, K. K., FINN, J., STUCKEY, B., GIBSON, N., SANFILIPPO, F., BREMNER, A., *et al.* (2009). Erectile Dysfunction as a Predictor for Subsequent Atherosclerotic Cardiovascular Events: Findings from a Linked-Data Study. *J Sex Med*, 7(1), 192-202.
- DANIELS, S. R. & GREER, F. R. (2008). Lipid screening and cardiovascular health in childhood. *Pediatrics*, 122(1), 198-208.
- DECHKUM, N., HANANANTACHAI, H., PATARAPOTIKUL, J., OHASHI, J., KRUDSOOD, S., LOOAREESUWAN, S., *et al.* (2006). Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) gene polymorphism is not associated with severe and cerebral malaria in Thailand. *Jpn J Infect Dis*, 59(4), 239-44.

- DESHMANE, S. L., KREMLEV, S., AMINI, S. & SAWAYA, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, 29(6), 313-326.
- DUBEY, S., KABRA, M., BAJPAI, A., PANDEY, R., HASAN, M., GAUTAM, R., *et al.* (2007). Serum leptin levels in obese Indian children relation to clinical and biochemical parameters. *Indian pediatr.*, 44(4), 257-262.
- FLORES-VILLANUEVA, P. O., RUIZ-MORALES, J. A., SONG, C. H., FLORES, L. M., JO, E. K., MONTANO, M., *et al.* (2005). A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med*, 202(12), 1649-1658.
- FREEDMAN, D. S., KATZMARZYK, P. T., DIETZ, W. H., SRINIVASAN, S. R. & BERENSON, G. S. (2009). Relation of body mass index and skinfold thicknesses to cardiovascular disease risk factors in children: the Bogalusa Heart Study. *Am J Clin Nutr*, 90(1), 210-216.
- GIRN, H. R., ORSI, N. M. & HOMER-VANNIASINKAM, S. (2007). An overview of cytokine interactions in atherosclerosis and implications for peripheral arterial disease. *Vasc Med*, 12(4), 299-309.
- GONZALEZ, E., ROVIN, B. H., SEN, L., COOKE, G., DHANDA, R., MUMMIDI, S., *et al.* (2002). HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21), 13795-13800.
- GUSTAFSON, B., HAMMARSTEDT, A., ANDERSSON, C. X. & SMITH, U. (2007). Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(11), 2276-2283.
- HARSIMRAN, K., SINGH, A. A. P., GURUVINDER, S., SHARDA, S. & VASUDHA, S. (2009). Plasma monocyte chemoattractant protein-1 as risk marker in type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease in North Indians. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 6(4), 288-290.
- HO, T. F. (2009). Cardiovascular risks associated with obesity in children and adolescents. *Ann Acad Med Singapore*, 38(1), 48-9.
- JEMAA, R., BEN ALI, S., KALLEL, A., OMAR, S., FEKI, M., ELASMI, M., *et al.* (2008). Association between the -2518G/A polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene and hypertension in Tunisian patients. *Clin Biochem*, 42(1-2), 34-37.
- JEMAA, R., ROJBANI, H., KALLEL, A., BEN ALI, S., FEKI, M., CHABRAK, S., *et al.* (2008). Association between the -2518G/A polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene and myocardial infarction in Tunisian patients. *Clin Chim Acta*, 390(1-2), 122-125.
- JOLLIFFE, C. J. & JANSSEN, I. (2006). Vascular risks and management of obesity in children and adolescents. *Vasc Health Risk Manag*, 2(2), 171-187.
- KIM, C-S., PARK, H-S., KAWADA, T., KIM, J-H., LIM, D., HUBBARD, NE., *et al.* (2006). Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes*, 30(9), 1347-1355.
- KOUYAMA, K., MIYAKE, K., ZENIBAYASHI, M., HIROTA, Y., TERANISHI, T., TAMORI, Y., *et al.* (2007). Association of serum MCP-1 concentration and

- MCP-1 polymorphism with insulin resistance in Japanese individuals with obese type 2 diabetes. *Kobe J Med Sci*, 53(6), 345-54.
- LAU, D. C., DHILLON, B., YAN, H., SZMITKO, P. E. & VERMA, S. (2005). Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(5), H2031-2041.
- MALAVAZOS, A. E., CEREDA, E., MORRICONE, L., COMAN, C., CORSI, M. M. & AMBROSI, B. (2005). Monocyte chemoattractant protein 1: a possible link between visceral adipose tissue-associated inflammation and subclinical echocardiographic abnormalities in uncomplicated obesity. *Eur. J. Endocrinol.*, 153(6), 871-877.
- MANGGE, H., SCHAUENSTEIN, K., STROEDTER, L., GRIESL, A., MAERZ, W., BORKENSTEIN, M. (2004). Low grade inflammation in juvenile obesity and type 1 diabetes associated with early signs of atherosclerosis. *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes*, 112(7), 378-382.
- MINE, S., OKADA, Y., TANIKAWA, T., KAWAHARA, C., TABATA, T. & TANAKA, Y. (2006). Increased expression levels of monocyte CCR2 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun*, 344(3), 780-785.
- PAPADOPOULOU, C., CORRIGALL, V., TAYLOR, P. R. & POSTON, R. N. (2008). The role of the chemokines MCP-1, GRO-alpha, IL-8 and their receptors in the adhesion of monocytic cells to human atherosclerotic plaques. *Cytokine*, 43(2), 181-186.
- PINTO, N. M., MARINO, B. S., WERNOVSKY, G., DE FERRANTI, S. D., WALSH, A. Z., LARONDE, M., *et al.* (2007). Obesity Is a Common Comorbidity in Children With Congenital and Acquired Heart Disease. *Pediatrics*, 120(5), e1157-1164.
- RAINES, E. W. & FERRI, N. (2005). Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *J Lipid Res*, 46(6), 1081-1092.
- RAMOS ARELLANO LE. Polimorfismos A19G en el gen de leptina y A668G en su receptor y su relación con las concentraciones de leptina sérica y la hiperfagia en niños con obesidad. Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Maestría en Ciencias Biomédicas; 2009.
- ROVIN, B. H., LU, L. & SAXENA, R. (1999). A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 259(2), 344-348.
- SAENZ-LOPEZ, P., CARRETERO, R., COZAR, J. M., ROMERO, J. M., CANTON, J., VILCHEZ, J. R., *et al.* (2008). Genetic polymorphisms of RANTES, IL1-A, MCP-1 and TNF-A genes in patients with prostate cancer. *BMC Cancer*, 19(8), 382.
- SARTIPY, P., LOSKUTOFF, D. J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Nat Acad Sci USA*, 100(12), 7265-7270.
- SEDLMEIER, E. M., GRALLERT, H., HUTH, C., LÖWEL, H., HERDER, CH., STRASSBURGER, K., *et al.* (2007). Gene variants of monocyte chemoattractant protein 1 and components of metabolic syndrome in KORA S4, Augsburg. *European J Endocrinol*, 156, 377-385.

- SELL, H., DIETZE-SCHROEDER, D., KAISER, U. & ECKEL, J. (2006). Monocyte Chemotactic Protein-1 Is a Potential Player in the Negative Cross-Talk between Adipose Tissue and Skeletal Muscle. *Endocrinology*, 147(5), 2458-2467.
- SIMEONI, E., HOFFMANN, M. M., WINKELMANN, B.R., RUIZ, J., FLEURY, S. BOEHM, B.O., MÄRZ, W., *et al.* (2004). Association between the A-2518G polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 gene and insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 47(9), 1574-1580.
- SORIANO-GUILLEN, L., HERNANDEZ-GARCIA, B., PITA, J., DOMINGUEZ-GARRIDO, N., DEL RIO-CAMACHO, G. & ROVIRA, A. (2008). High-sensitivity C-reactive protein is a good marker of cardiovascular risk in obese children and adolescents. *Eur. J. Endocrinol*, 159(1), R1-4.
- TATEYA, S., TAMORI, Y., KAWAGUCHI, T., KANDA, H. & KASUGA, M. (2010). An Increase in the Circulating Concentration of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Elicits Systemic Insulin Resistance Irrespective of Adipose Tissue Inflammation in Mice. *Endocrinology*, 151(3), 971-979.
- TEDGUI, A. & MALLAT, Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*, 86(2), 515-81.
- TUCCI, M., BARNES, E. V., SOBEL, E. S., CROKER, B. P., SEGAL, M. S., REEVES, W. H. & RICHARDS, H. (2004). Strong association of a functional polymorphism in the monocyte chemoattractant protein 1 promoter gene with lupus nephritis. *Arthritis Rheum.*, 50(6), 1842-1849.
- UEDA, A., OKUDA, K., OHNO, S., SHIRAI, A., IGARASHI, T., MATSUNAGA, K., *et al.* (1994). NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J. Immunol.*, 153(5), 2052-2063.
- VÁZQUEZ-LAVISTA, L., LIMA, G., GABILONDO, F., LLORENTE, L. (2009). Genetic Association of Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1)-2518 Polymorphism in Mexican Patients With Transitional Cell Carcinoma Of the Bladder. *J Urology*, 74(2),414-418.
- WRIGHT JR, E., PAGE, S., BARBER, S. & CLEMENTS, J. (2008). Prep1/Pbx2 complexes regulate CCL2 expression through the- 2578 guanine polymorphism. *Genes and immunity*, 9(5), 419.
- YUASA, S., MARUYAMA, T., YAMAMOTO, Y., HIROSE, H., KAWAI, T., MATSUNAGA-IRIE, S. & ITOH, H. (2009). MCP-1 gene A-2518G polymorphism and carotid artery atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 86(3), 193-198.
- ZINEH, I., BEITELSHEES, A. L., SILVERSTEIN, J. H. & HALLER, M. J. (2009). Serum monocyte chemoattractant protein-1 concentrations associate with diabetes status but not arterial stiffness in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 32(3), 465-467.