



## Trabajo Original

Otros

### Variabilidad del marcador genético CLOCK rs3749474 y su impacto en investigaciones y pruebas clínicas sobre obesidad y ritmo circadiano

*Variability of the genetic marker CLOCK rs3749474 and its impact on research and clinical trials on obesity and circadian rhythm*

Ángel Roco-Videla<sup>1</sup>, Sergio V. Flores<sup>2,3</sup>, Mariela Olguin-Barraza<sup>4,5</sup>, Nelson Maureira-Carsalade<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Salud y Ciencias Sociales. Universidad de las Américas. Santiago, Chile. <sup>2</sup>Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de Chile. Chile.

<sup>3</sup>Departamento de Ingeniería Industrial. Facultad de Ingeniería y Tecnología. Universidad San Sebastián. Chile. <sup>4</sup>Facultad de Ciencias de la Salud. Programa de Magister en Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Bernardo O'Higgins. Santiago, Chile. <sup>5</sup>Escuela de Tecnología Médica. Facultad de Ciencias. Universidad Mayor. Chile.

<sup>6</sup>Departamento de Ingeniería Civil. Facultad de Ingeniería. Universidad Católica de la Santísima Concepción. Concepción, Chile

### Resumen

**Introducción:** los ritmos circadianos influyen en la conducta alimentaria, siendo el gen CLOCK uno de los encargados de su regulación. El rs3749474T/C del gen CLOCK ha sido asociado a un mayor riesgo de obesidad y quienes portan el alelo T presentan una mayor pérdida de peso ante una dieta baja en carbohidratos y lípidos que quienes poseen la forma CC.

**Material y métodos:** usando la base de datos 1000 Genomes se obtuvo el genotipo del polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs3749474 de 2.504 individuos, abarcando cinco macropoblaciones (África, Este Asiático, Sur Asiático, Europa y Latinoamérica) y 26 poblaciones. CT y TT fueron tratados como genotipos de no riesgo y CC, como de riesgo. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para comparar las frecuencias de los genotipos de riesgo y no riesgo.

**Resultados:** existe una alta diferenciación para la frecuencia de genotipos portadores del alelo T entre las macropoblaciones: África alcanzó solo el 31,47 %; Europa, un 56,86 %; Latinoamérica, un 66,28 %; el Sur Asiático, un 68,3 %; y el Este Asiático, un 81,15 %, con diferencias significativas ( $p_{\text{Fisher}} < 0,05$ ) en todas las comparaciones, excepto entre Latinoamérica y Sur Asiático. Se observó una baja heterogeneidad entre poblaciones dentro de cada macropoblación.

**Conclusiones:** la alta heterogeneidad para las frecuencias genotípicas de CLOCK rs3749474 en las macropoblaciones estudiadas indica que la disminución del consumo de carbohidratos y lípidos tendrá un impacto heterogéneo desde el punto de vista epidemiológico. Esto sugiere incluir la ancestría genética en posteriores estudios de asociación entre ciclos circadianos, conducta alimentaria y obesidad, con el objeto de desarrollar pruebas clínicas personalizadas.

#### Palabras clave:

Ritmo circadiano. Gen CLOCK. Obesidad. rs3749474.

Recibido: 15/05/2022 • Aceptado: 15/06/2022

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Roco-Videla A, Flores SV, Olguin-Barraza M, Maureira-Carsalade N. Variabilidad del marcador genético CLOCK rs3749474 y su impacto en investigaciones y pruebas clínicas sobre obesidad y ritmo circadiano. Nutr Hosp 2022;39(5):1117-1121

DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.04230>

#### Correspondencia:

Ángel Roco-Videla. Facultad de Salud y Ciencias Sociales. Universidad de las Américas. Av. Manuel Montt, 948. Providencia, Santiago. Chile  
e-mail: [aroco@udla.cl](mailto:aroco@udla.cl)

## Abstract

**Introduction:** circadian rhythms influence eating behavior, with the CLOCK gene being one of those responsible for its regulation. The rs3749474T/C of the CLOCK gene has been associated with an increased risk of obesity. Those who carry the T allele have greater weight loss on a diet low in carbohydrates and lipids than those who have the CC form.

**Methodology:** using the 1000 Genomes database, the genotype of the single nucleotide polymorphism (SNP) rs3749474 was obtained from 2,504 individuals, covering five macro-populations (Africa, East Asia, South Asia, Europe and Latin America) and 26 populations. CT and TT were treated as non-risk genotypes and CC as risk. Fisher's exact test was used to compare the frequencies of risk and non-risk genotypes among the five macro populations.

**Results:** there is a high differentiation for the frequency of genotypes carrying the T allele among the macro-populations: Africa reached only 31.47 %, Europe 56.86 %; Latin America 66.28 %; South Asia 68.3 % and East Asia 81.15 %, with significant differences ( $p_{\text{Fisher}} < 0.05$ ) in all comparisons, except between Latin America and South Asia. Low heterogeneity was observed between populations within each macro population.

**Conclusions:** the high heterogeneity for the genotypic frequencies of CLOCK rs3749474 in the studied macro-populations indicates that the decrease in the consumption of carbohydrates and lipids will have a heterogeneous impact, from the epidemiological point of view. This suggests including the genetic ancestry in later studies of association between circadian cycles, eating behavior and obesity, in order to develop personalized clinical tests.

### Keywords:

Circadian rhythm. CLOCK gene. Obesity. rs3749474.

## INTRODUCCIÓN

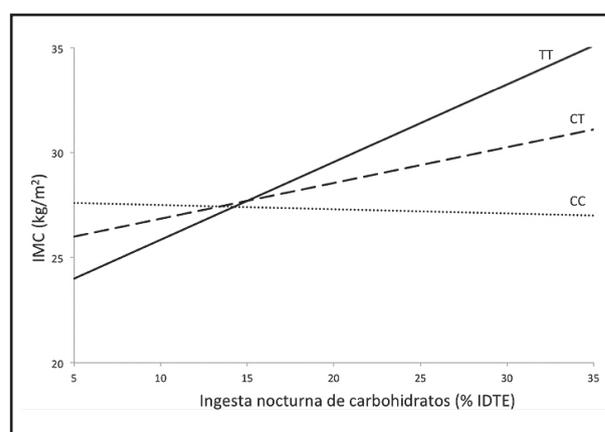
El estado nutricional de un individuo es, principalmente, el resultado de su conducta alimentaria, pero también de sus ritmos circadianos. Estos corresponden a las variaciones periódicas de 24 horas que son controladas por el sistema nervioso central y que regulan los ciclos luz-oscuridad (1).

Entre los genes que están asociados a la regulación de los ritmos circadianos, tenemos al *circadian locomotor output cycles kapu* (CLOCK), el cual sincroniza el ciclo luz-oscuridad con los tiempos de ingesta-ayuno y de actividad-reposo en los individuos (2).

En la actualidad, se ha descrito un gran número de variantes genéticas del tipo polimorfismo de nucleótido único (*single nucleotide polymorphisms* [SNP]) del gen CLOCK, entre las cuales está el rs3749474T/C (3). Los portadores del alelo T de este polimorfismo presentan una mayor obesidad abdominal (circunferencia de cintura), un alto índice de masa corporal (IMC) y un elevado consumo de energía, principalmente a partir de ácidos grasos, en comparación con sujetos homocigotos CC del mismo polimorfismo (4-6).

Por otro lado, se ha establecido que quienes poseen los genotipos TT y TC de rs3749474 tienden a tener una mejor pérdida de peso después de un tratamiento que implica la restricción de grasas en la dieta, en comparación con quienes poseen el homocigoto de tipo CC (7). Además, quienes presentan los polimorfismos en homocigosis o heterocigosis del rs3749474 y suelen tener un hábito de ingesta nocturna de carbohidratos y poseen un IMC más alto que la población general (8). Se ha demostrado que existe una asociación entre el ser portador de los alelos menores de rs3749474 del gen CLOCK y la ingesta de energía, lo cual conllevaría a aumentar el riesgo de desarrollar obesidad (5).

La figura 1 representa el modelo de determinación de los genotipos rs3749474 en relación con el IMC. Mientras que los portadores del alelo T, es decir TT y CT, presentan una asociación directamente proporcional entre consumo de carbohidratos (y lípidos) e IMC, los que presentan el genotipo CC poseen una leve asociación inversa, o bien ausencia de asociación, dependiendo del estudio y la población analizada. La relación causal entre los



**Figura 1.**

Modelo de interacción de los genotipos del SNP CLOCK rs3749474 en relación con la ingesta de nutrientes, basado en Cambor y cols. (8). IMC: índice de masa corporal; IDTE: ingesta diaria total de energía.

genotipos portadores del alelo T y el incremento del IMC es, entonces, un factor de riesgo de obesidad. Como consecuencia de lo anterior, los individuos portadores del alelo T presentan una mejor respuesta ante la disminución de carbohidratos y lípidos en la dieta, disminuyendo el IMC (8).

Dado lo anterior, resulta relevante conocer la incidencia de los genotipos portadores del alelo T en diferentes poblaciones. El alelo C es el alelo ancestral, por lo que se espera se presente en mayor frecuencia en poblaciones africanas y en menor frecuencia en otras poblaciones, especialmente las más recientes, como la latinoamericana. No obstante, factores microevolutivos ocurridos en la historia de las poblaciones humanas podrían haber producido diferentes patrones de variabilidad en este marcador genético.

En este estudio analizamos el patrón de variabilidad de los genotipos portadores del alelo T del marcador CLOCK rs3749474 en poblaciones humanas actuales, lo que podría aportar evidencia de base para futuros estudios biomédicos y epidemiológicos, así como para la implementación de pruebas genéticas-clínicas para medidas preventivas e intervenciones clínicas personalizadas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvo el genotipo del SNP rs3749474 de 2.504 individuos a partir de la base de datos 1000 Genomes (9). Para esto, se descargó el total de la base de datos en su fase 3, para luego extraer los genotipos de rs3749474 para cada individuo usando la herramienta VCFtools. Esta base de datos abarca 2.504 individuos de 26 poblaciones. Los datos de baja cobertura (4x) están

presentes para todos estos individuos, así como los de 24 individuos con alta cobertura (50x), con fines de validación. La muestra incluyó las siguientes macropoblaciones: África, Este Asiático, Sur Asiático, Europa y Latinoamérica, abarcando en total 26 poblaciones, cuyo detalle se muestra en la tabla I. El porcentaje de mujeres en la muestra es del 50,9 %. No obstante, variables como la edad y el sexo de los participantes no influyen en los resultados, pues rs3749474 es un marcador genético autosomal.

**Tabla I.** Información sobre las macropoblaciones y poblaciones analizadas en este estudio

Macropoblación (código)	Población	Código	n
África (AFR)	Caribe-africanos en Barbados	ACB	96
	Ancestría africana en el suroeste de Estados Unidos	ASW	61
	Esan en Nigeria	ESN	99
	Gambianos del oeste	GWD	113
	Luhya en Webuye, Kenia	LWK	99
	Mendés en Sierra Leona	MSL	85
	Yorubas en Ibadán, Nigeria	YRI	108
			<i>Total: 661</i>
América (AMR)	Colombianos en Medellín	CLM	94
	Ancestría mexicana en Los Ángeles, Estados Unidos	MXL	64
	Peruanos en Lima	PEL	85
	Puertorriqueños en Puerto Rico	PUR	104
			<i>Total: 347</i>
Este Asiático (EAS)	Chinos Dai en Xishuangbanna, China	CDX	93
	Chinos Han en Beijing, China	CHB	103
	Chinos Han del sur	CHS	105
	Japoneses en Tokio	JPT	104
	Kinh en Ciudad Ho Chi Minh, Vietnam	KHV	99
			<i>Total: 504</i>
Europa (EUR)	Utaheño con ancestría del norte y oeste europeo	CEU	99
	Fineses en Finlandia	FIN	99
	Británicos en Inglaterra y Escocia	GBR	91
	Ibéricos en España	IBS	107
	Toscanos en Italia	TSI	107
			<i>Total: 503</i>
Sur Asiático (SAS)	Bengalíes en Bangladesh	BEB	99
	Gujarati en Houston, Texas	GIH	99
	Telugu en Reino Unido	ITU	91
	Punjabi en Lahore, Pakistán	PJL	107
	Sri Lanka Tamil en Reino Unido	STU	107
			<i>Total: 489</i>

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El genotipo CC se codificó como genotipo de riesgo (1), mientras que los otros dos (CT y TT) se codificaron como de no riesgo (0), esto considerando que el alelo T confiere una mejor respuesta a una dieta baja en carbohidratos (8). Se estimó la frecuencia del genotipo de riesgo en las cinco macropoblaciones y se compararon sus frecuencias usando la prueba exacta de Fisher.

Tanto la construcción de la base de datos (disponible como material suplementario) como la estadística descriptiva (estimación de frecuencias) y la estadística inferencial (comparación de frecuencias) se realizaron con el programa R (10).

### RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados según distribución de las cinco macropoblaciones relevantes (Fig. 2). La menor frecuencia de genotipos portadores del alelo T se encuentra en África, seguida de Europa, Latinoamérica, Sur Asiático y Este Asiático, en orden creciente. Es notoria la baja frecuencia observada entre África y las otras cuatro macropoblaciones.

Al comparar las frecuencias genotípicas entre todos los pares de poblaciones, se confirma la alta divergencia de África. Además, existen diferencias significativas ( $p_{\text{Fisher}} < 0,05$ ) en todas las comparaciones excepto entre Latinoamérica y Sur Asiático (Tabla II).

La figura 3 muestra las frecuencias de genotipos portadores del alelo T en las 26 poblaciones de este estudio. Se destaca la alta homogeneidad de las frecuencias dentro de cada macropoblación. La excepción a este patrón corresponde a Lima, Perú, que muestra una mayor frecuencia de genotipos de no riesgo en relación con las otras poblaciones latinoamericanas ( $p_{\text{Fisher}} < 0,05$ ).

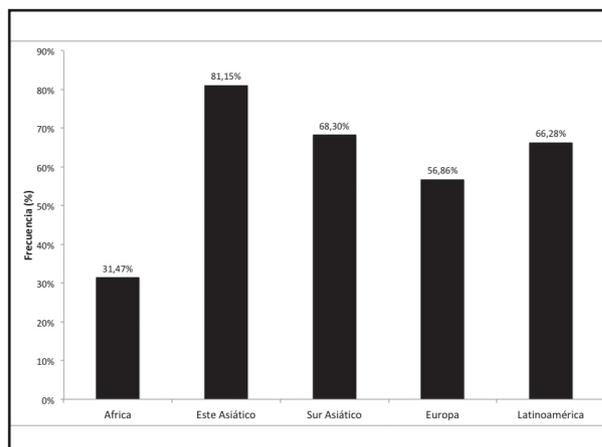


Figura 2.

Frecuencia de genotipos portadores del alelo T (TT y CT) en las cinco macropoblaciones de este estudio.

Tabla II. Prueba exacta de Fisher para la comparación del número de genotipos de riesgo (TT + CT) y no riesgo (CC) entre pares de macropoblaciones

	África	Este Asiático	Sur Asiático	Europa
Este Asiático	$2,2 \times 10^{-16}$			
Sur Asiático	$2,2 \times 10^{-16}$	$3,758 \times 10^{-6}$		
Europa	$2,2 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{-16}$	0,0002356	
Latinoamérica	$2,2 \times 10^{-16}$	$1,164 \times 10^{-6}$	0,5497 (ns)	0,006594

ns: no significativo.

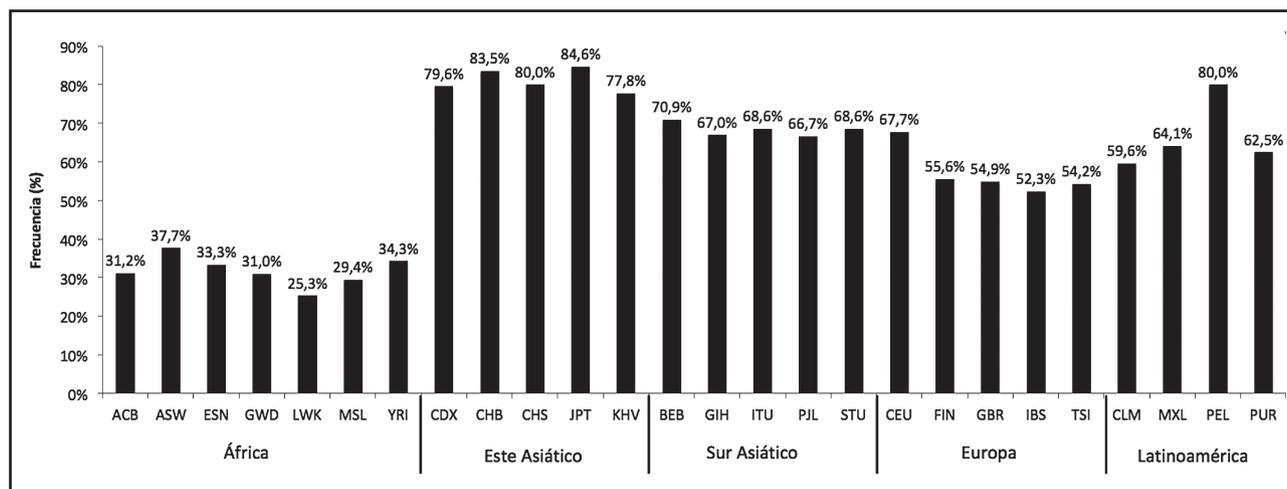


Figura 3.

Frecuencia de genotipos portadores del alelo T (TT y CT) en las 26 poblaciones de este estudio.

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran una alta divergencia para la frecuencia de genotipos portadores del alelo T en África, en relación con las otras cuatro macropoblaciones. Mientras que en África esta frecuencia alcanza solo el 31,47 %, en las restantes macropoblaciones esta frecuencia varía entre el 56,86 % (Europa) y el 81,15 % (Este Asiático). Por lo tanto, si nos guiamos por los resultados obtenidos por Cambior-Murube y cols. (8), se podría predecir que poblaciones africanas presentarían menor aumento del IMC debido al consumo de carbohidratos y, al mismo tiempo, menor respuesta ante dietas bajas en ellos. Por otra parte, se espera encontrar un patrón inverso para personas del Este Asiático, las cuales presentarían una alta asociación entre IMC y el consumo de carbohidratos y una alta respuesta a dietas bajas en este tipo de nutrientes.

La alta diferenciación de las poblaciones africanas podría ser consecuencia de patrones dietarios ancestrales, probablemente menos dependientes de la ingesta de carbohidratos, lo que es consistente con estudios enfocados en los patrones dietarios en estas poblaciones (11). Así, podría inferirse que la diferenciación observada respondería a los cambios dietarios experimentados durante la última transición alimentaria (12).

La mayor diferencia se observa al comparar macropoblaciones entre sí, puesto que existiría una alta homogeneidad dentro de cada una de ellas (a excepción de la macropoblación latinoamericana, donde la población de Lima, en Perú, destaca sobre el resto). Esta observación se traduce en que la predicción del éxito de dietas bajas en carbohidratos requeriría de la cuantificación de ancestría genética para estas cinco macropoblaciones ancestrales, siendo marginal el efecto de aquellas derivadas de poblaciones locales.

En Chile, es escasa la investigación referente al gen CLOCK, y los estudios que se han realizado en relación con el SNP rs3749474 T/C han contado con tamaños muestrales pequeños y solo han participado sujetos jóvenes. No obstante, los resultados confirman lo encontrado en investigaciones en otras regiones geográficas, asociando un mayor riesgo de obesidad en portadores del alelo T y aportando evidencias de interacción con el SNP rs4864548A (13, 14). Dado lo anterior, posteriores investigaciones podrían incluir otras poblaciones latinoamericanas, a fin de contrastar la evidencia aquí reportada y contribuir así a la creación de un perfil de variabilidad a nivel subcontinental para diferentes loci de CLOCK asociados a obesidad y a la respuesta a dietas.

Si bien el presente estudio permite predecir la incidencia del alelo rs3749474 T dentro de las cinco macropoblaciones analizadas, una limitación de este estudio tiene relación con la existencia de particularidades poblacionales que no son aquí abarcadas. Por ejemplo, la existencia de poblaciones de diferentes ancestrías dentro de las macropoblaciones, como es el caso de poblaciones indígenas, que pueden presentar diferenciación genética respecto de sus respectivas macropoblaciones. Otra limitación tiene relación con el hecho de que la muestra con que

se creó la base de datos 1000 Genomes corresponde a sujetos voluntarios, por lo que los resultados tienen un sesgo asociado al hecho de ser una muestra intencionada.

Finalmente, este trabajo presenta evidencia que contribuye a la generación de modelos probabilísticos para el éxito de dietas bajas en carbohidratos según las cinco macropoblaciones estudiadas. El tránsito hacia terapias médicas basadas en evidencia genómica personalizada, considerando la ancestría genética como uno de los factores causales, se hace cada vez más factible de incorporar a las decisiones biomédicas, como sería en el caso del gen CLOCK y su relación con ciclos circadianos, susceptibilidad a la obesidad y respuesta dietaria.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Domínguez-Vásquez P, Olivares S, Santos J. Eating behavior and childhood obesity: family influences. *Arc Latinoam Nutr* 2008;58:249-55.
2. Gómez-Abellán P, Madrid J, Ordoñas J, Garaulet M. Chronobiological aspects of obesity and metabolic syndrome. *Endocrinol Nutr* 2012;59(1):50-61. DOI: 10.1016/j.endoen.2011.08.002
3. Sookoian S, Gemma C, Gianotti T, Burgueño A, Castaño G, Pirola C. Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *Am J Clin Nutr* 2008;87(6):1606-15. DOI: 10.1093/ajcn/87.6.1606
4. Garaulet M, Lee Y, Shen J, Parnell L, Arnett D, Tsai M, et al. CLOCK genetic variation and metabolic syndrome risk: modulation by monounsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2009;90(6):1466-75. DOI: 10.3945/ajcn.2009.27536
5. Garaulet M, Lee Y, Shen J, Parnell L, Arnett D, Tsai M, et al. Genetic variants in human CLOCK associate with total energy intake and cytokine sleep factors in overweight subjects (GOLDN population). *Eur J Hum Genet* 2009;18(3):364-9. DOI: 10.1038/ejhg.2009.176
6. Espinosa-Salinas I, San-Cristóbal R, Colmenarejo G, Loria-Kohen V, Molina S, Reglero G, et al. Polymorphic appetite effects on waist circumference depend on rs3749474 CLOCK gene variant. *Nutrients* 2020;12(6):1846. DOI: 10.3390/nu12061846
7. Loria-Kohen V, Espinosa-Salinas I, Marcos-Pasero H, Lourenço-Nogueira T, Herranz J, Molina S, et al. Polymorphism in the CLOCK gene may influence the effect of fat intake reduction on weight loss. *Nutrition* 2016;32:453-60. DOI: 10.1016/j.nut.2015.10.013
8. Cambior Murube M, Borregon-Rivilla E, Colmenarejo G, Aguilar-Aguilar E, Martínez J, Ramírez De Molina A, et al. Polymorphism of CLOCK gene rs3749474 as a modulator of the circadian evening carbohydrate intake impact on nutritional status in an adult sample. *Nutrients* 2020;12(4):1142. DOI: 10.3390/nu12041142
9. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Garrison EP, Abecasis GR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526(7571):68-74. DOI: 10.1038/nature15393
10. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2016. Available from: <https://www.R-project.org/>
11. Akarolo-Anthony S, Odubore F, Yilme S, Aragbada O, Oduye G, Hu F, et al. Pattern of dietary carbohydrate intake among urbanized adult Nigerians. *Int J Food Sci Nutr* 2012;64(3):292-9. DOI: 10.3109/09637486.2012.746290
12. John D, Babu G. What is the modern human eating? Dietary transition of the age-old to the modern man of India. *Public Health Rev* 2022;43:1604058. DOI: 10.3389/phrs.2022.1604058
13. Pino-Astorga C, Roco-Videla A, Valladares Vega M. Potential joint effect of the SNP rs3749474T and SNPrs4864548A alleles of the CLOCK gene on nutritional status and chronotype in young university students. *Salud Uninorte* 2022;37(1):606-18. DOI: 10.14482/sun.37.1.613.2
14. Pino Astorga C, Roco-Videla A, Peña lara D, Vásquez Aliaga S, Madrid Áviles G, Obregón Vera AM, et al. Comparación del estado nutricional, cronotipo y conducta alimentaria en estudiantes universitarios chilenos que presentan el polimorfismo rs3749474T/C o rs4864548A/G del gen CLOCK. *Rev Esp Nutr Comunitaria* 2020;26(1):10-5. DOI: 10.14642/RENC.2020.26.1.5308