



## Trabajo Original

## Obesidad y síndrome metabólico

### Prevalencia del haplotipo de riesgo GA de los polimorfismos rs1554483 y rs4864548 del gen CLOCK asociados a la obesidad y el sobrepeso en 26 poblaciones

### *Prevalence of the GA risk haplotype of the rs1554483 and rs4864548 polymorphisms of the CLOCK gene associated with obesity and overweight in 26 populations*

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

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de Chile. Santiago, Chile. <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Industrial. Facultad de Ingeniería y Tecnología. Universidad San Sebastián. Santiago, Chile. <sup>3</sup>Facultad de Salud y Ciencias Sociales. Universidad de las Américas. Santiago, Chile. <sup>4</sup>Programa de Magíster en Ciencias Químico-Biológicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Bernardo O'Higgins. Santiago, Chile. <sup>5</sup>Escuela de Tecnología Médica. Facultad de Ciencias. Universidad Mayor. Santiago, Chile. <sup>6</sup>Departamento de Ingeniería Civil. Facultad de Ingeniería. Universidad Católica de la Santísima Concepción. Concepción, Chile

### Resumen

**Introducción:** el haplotipo GA de los polimorfismos rs1554483 y rs4864548 se ha asociado con componentes del síndrome metabólico como la hipertensión arterial y los niveles de triglicéridos. Sus portadores presentan un riesgo de obesidad 1,5 veces mayor que el resto de la población.

**Metodología:** se obtuvieron los SNP rs1554483 y rs4864548 de 2504 individuos desde la base de datos "1000genomes phase 3". Los datos se agruparon en cinco macropoblaciones (África, Asia Oriental, Asia Meridional, Europa y Latinoamérica) cubriendo un total de 26 poblaciones. Se analizaron las diferencias en la frecuencia del haplotipo entre las macropoblaciones y las poblaciones, para lo cual se utilizó el estadístico F de Fisher.

**Resultados:** la macropoblación de África presentó la menor frecuencia (17,9 %) y la del Este de Asia la mayor (57,4 %). Dentro de las poblaciones existe una relativa homogeneidad en las frecuencias, excepto en el caso de las que componen la macropoblación de Latinoamérica, donde la población peruana de Lima y la puertorriqueña presentan frecuencias mucho mayores que el resto.

**Conclusiones:** el haplotipo GA presenta heterogeneidad entre las macropoblaciones, lo que sugiere procesos microevolutivos altamente diferenciados entre los continentes. Se propone estudiar la asociación del haplotipo GA con otros polimorfismos, como rs3749474, rs11932595 y rs6859524, que también se han asociado con el riesgo de obesidad y factores asociados al síndrome metabólico.

#### Palabras clave:

Gen *CLOCK*. Obesidad. Síndrome metabólico. rs1554483. rs4864548.

### Abstract

**Introduction:** the GA haplotype of polymorphisms rs1554483 and rs4864548 has been associated with components of the metabolic syndrome such as high blood pressure and triglyceride levels; its carriers have a risk of obesity, 1.5 times higher than the rest of the population.

**Methodology:** SNP rs1554483 and rs4864548 were obtained from 2504 individuals from the "1000genomes phase 3" database. Data were grouped into five macro populations (Africa, East Asia, South Asia, Europe and Latin America) covering a total of 26 populations. Differences in haplotype frequency between macro populations and populations were analyzed, for which Fisher's F statistic was used.

**Results:** the macro population of Africa presented the lowest frequency (17.9 %) and that of East Asia the highest (57.4 %). Within the populations there is a relative homogeneity in the frequencies, except in the case of those that make up the macro population of Latin America where the Peruvian population of Lima and the Puerto Rican population present much higher frequencies than the rest.

**Conclusions:** the GA haplotype presents heterogeneity between macro populations, which suggests highly differentiated micro evolutionary processes between continents. We propose to study the association of the GA haplotype with other polymorphisms such as rs3749474, rs11932595 and rs6859524 that have also been associated with risk of obesity and factors associated with metabolic syndrome.

#### Keywords:

*CLOCK* gene. Obesity. Metabolic syndrome. rs1554483. rs4864548.

Recibido: 26/05/2022 • Aceptado: 09/11/2022

*Conflicts of interest: los autores declaran no tener conflictos de intereses.*

Flores S, Roco-Videla Á, Olguín-Barraza M, Maureira-Carsalade N. Prevalencia del haplotipo de riesgo GA de los polimorfismos rs1554483 y rs4864548 del gen CLOCK asociados a la obesidad y el sobrepeso en 26 poblaciones. *Nutr Hosp* 2023;40(3):529-533

DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.04256>

#### 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)

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, los indicadores de sobrepeso y obesidad están aumentando de manera alarmante. Ambas condiciones implican una acumulación de grasa en el tejido adiposo, lo que deriva en hipertrofia y desequilibrio de los procesos hemostáticos en que está involucrado (1). Estas condiciones de salud aumentan el riesgo de hipertensión, diabetes, eventos cardiovasculares, osteopatía e incluso cáncer (2-4).

En la actualidad, las estrategias dietéticas ya no solo se elaboran en función de la cantidad de calorías o macronutrientes consumidos sino también en la distribución circadiana a lo largo del día (ciclo circadiano) vinculada con la ingesta alimentaria (5-7). Esta distribución circadiana está regulada, entre otros, por el gen *CLOCK* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kapu*), el cual influye en la regulación del peso, cuyo proceso es mediado por áreas del cerebro que estarían involucradas en el control de las funciones endocrinas relevantes a través de hormonas y neurotransmisores anoréxicos y orexígenos (8). Diferentes estudios sugieren que la diferenciación y la proliferación de adipocitos están reguladas por ritmos circadianos (9).

Se ha demostrado que ciertos polimorfismos del gen *CLOCK* están asociados con disfunciones metabólicas que aumentan el riesgo de obesidad y sobrepeso. Entre ellos está el polimorfismo rs48 64548 A/G, donde el alelo G es el de mayor frecuencia (10). No obstante, los portadores del alelo A son los que presentan mayor riesgo de obesidad y sobrepeso (11). En el caso del polimorfismo rs1554483

C/G, los portadores del alelo G, al estar en forma de haplotipo con los rs11932595A, rs6850524G y rs4864548A (GAGA), han presentado mayor riesgo de desarrollar hígado graso (11). Cuando los polimorfismos rs1554483 y rs4864548 se encuentran como haplotipo GA (rs1554483G y rs4864548A), el riesgo de desarrollar sobrepeso u obesidad aumenta 1,5 veces (12). Además, ha presentado asociación con la presión arterial diastólica y sistólica, la hipertensión arterial, los niveles de triglicéridos y otros componentes del síndrome metabólico (13).

En este estudio analizamos el patrón de variabilidad del haplotipo de riesgo GA de los polimorfismos rs1554483G y rs4864548A en 26 poblaciones y 5 macropoblaciones, con el objeto de obtener evidencia que contribuya al estudio y diseño de terapias en individuos portadores afectados de enfermedades relacionadas con el metabolismo de los lípidos y el ciclo circadiano.

## METODOLOGÍA

### OBTENCIÓN DE LOS DATOS

Se obtuvieron los genotipos de los SNP rs1554483 y rs4864548 de 2504 individuos a partir de la base de datos "1000genomes phase 3" (14). La muestra comprende las siguientes macropoblaciones: África, Este Asiático, Sur Asiático, Europa y Latinoamérica, abarcando 26 poblaciones (Tabla I).

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

Macropoblación (código)	Población	Código	n
África (AFR)	Afrocaribeños en Barbados	ACB	96
	Ancestría africana en el suroeste de EE. UU.	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, EE. UU.	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>

(Continúa en página siguiente)

**Tabla I (Cont.).** Información sobre las macro poblaciones y poblaciones analizadas en este estudio

Macropoblación (código)	Población	Código	n
Europa (EUR)	Utaheños con ancestría del norte y oeste europeo	CEU	99
	Fineses en Finlandia	FIN	99
	Británicos en Inglaterra y Escocia	GBR	91
	Iberos en España	IBS	107
	Toscanos en Italia	TSI	107
			<i>Total: 503</i>
Sur de Asia (SAS)	Bengalíes en Bangladesh	BEB	99
	Guyaratíes en Houston, Texas	GIH	99
	Telugus en Reino Unido	ITU	91
	Punjabíes en Lahore, Pakistán	PJL	107
	Tamiles de Sri Lanka en Reino Unido	STU	107
			<i>Total: 489</i>

La base de datos usada incluye la fase de los alelos de cada marcador, es decir, la información de cada SNP se encuentra segregada para ambos miembros de cada par cromosómico. Para extraer los 5008 haplotipos de la muestra, los genotipos de cada población se descargaron en formato VCF (*variant call format*) y luego se transformaron a formato FASTA a través de un script ad hoc escrito en R (15). Usando el mismo software, se obtuvo la frecuencia de cada haplotipo observado según cada población y macropoblación.

### Análisis estadístico

Se compararon las frecuencias del haplotipo de riesgo GA de los polimorfismos rs1554483 y rs4864548 para cada par de macropoblaciones usando la prueba exacta de Fisher, utilizando el programa R con un intervalo de confianza del 95 % y un  $\alpha = 0,05$ .

Las pruebas de equilibrio de Hardy-Weinberg y de desequilibrio de ligamiento se realizaron en el programa Vcftools (16). Mientras la primera permite poner a prueba la consistencia entre frecuencias alélicas y genotípicas (por tanto, la ausencia de factores evolutivos), la segunda permite estimar el grado de asociación entre loci. Ambas pruebas se aplicaron a nivel tanto poblacional como macropoblacional y para los dos marcadores considerados en este estudio.

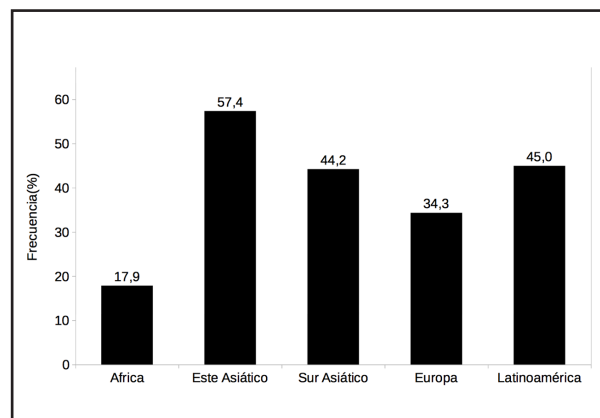
### RESULTADOS

Se observó una gran diferencia entre la frecuencia del haplotipo de riesgo GA de los polimorfismos rs1554483 y rs4864548 entre las 5 macropoblaciones de este estudio (Fig. 1). África es la que presenta la mayor divergencia, con la frecuencia más baja para el haplotipo de riesgo, seguida por Europa, Sur Asiático, Latinoamérica y Este Asiático. Esta observación fue ratificada por la prueba exacta de Fisher, en donde la única comparación

no significativa ( $p_{\text{Fisher}} > 0,05$ ) es entre el Sur Asiático y Latinoamérica (Tabla II).

En relación con la comparación de la frecuencia del haplotipo de riesgo en las 26 poblaciones revisadas (Fig. 2), se observa una relativa homogeneidad, a excepción de Latinoamérica, en donde la población peruana de Lima y la puertorriqueña presentan altas frecuencias (58,8 % y 59,8 %, respectivamente) en relación con las poblaciones colombiana de Medellín y mexicana de Ciudad de México (38,3 % y 43,8 %, respectivamente) ( $p_{\text{Fisher}} < 0,05$ ).

Ambos SNP se encuentran fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg cuando la muestra total no se subdivide poblacionalmente ( $p_{\text{chi}^2} = 3,03 \times 10^{-8}$  y  $3,01 \times 10^{-8}$  para el SNP rs1554483 y rs4864548, respectivamente). Al realizar este análisis en las 5 macropoblaciones, solo América Latina resultó fuera del equilibrio ( $p_{\text{chi}^2} = 0,017$  para ambos SNP). Finalmente, al realizar el análisis en las 26 poblaciones se encontró que solo la esan (Nigeria) está fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p_{\text{chi}^2} = 0,015$  para ambos SNP).



**Figura 1.**

Frecuencia del haplotipo de riesgo GA de los polimorfismos rs1554483 y rs4864548 en las 5 macropoblaciones de este estudio.

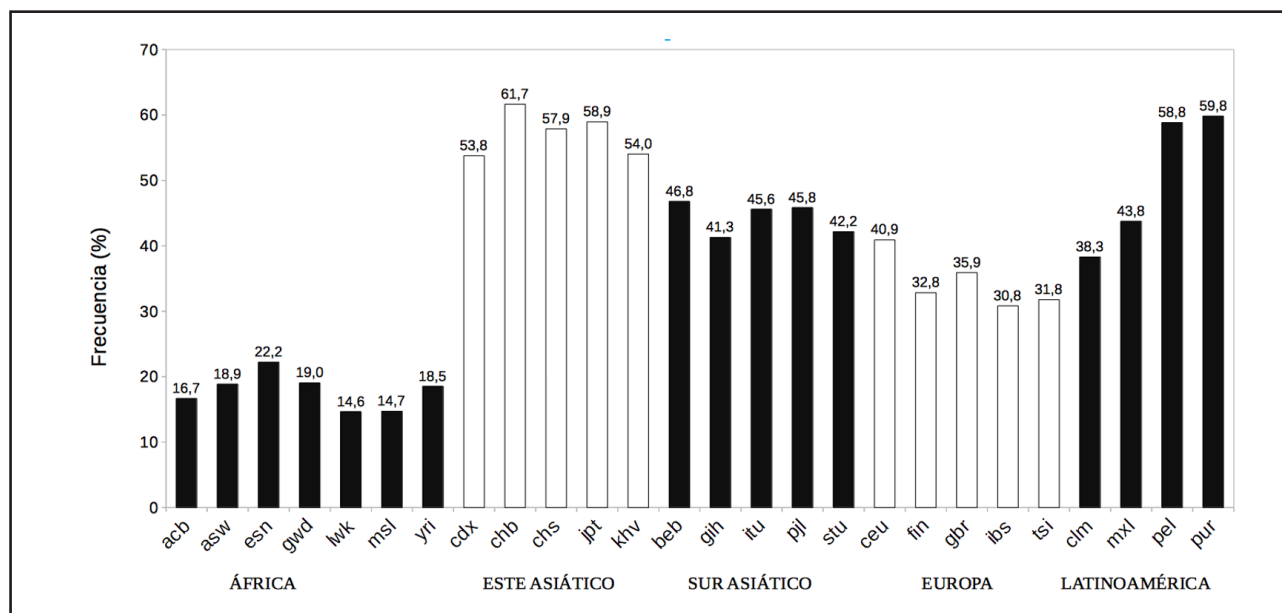
Finalmente, ambos SNP resultaron altamente ligados a nivel mundial ( $R^2 = 0,995$ ). A nivel de las macropoblaciones, los valores también indican una alta asociación entre los alelos de estos dos marcadores ( $R^2 = 1, 1, 0,983, 0,996$  y  $0,996$  para África,

Latinoamérica, Este Asiático, Europa y Sur Asiático, respectivamente). A nivel poblacional, las 26 poblaciones aquí estudiadas mostraron altos valores de desequilibrio de ligamiento ( $R^2$  entre  $0,96$  y  $1$ ).

**Tabla II.** Comparación de las frecuencias del haplotipo de riesgo GA de los polimorfismos rs1554483 y 4864548 para cada par de macropoblaciones usando la prueba exacta de Fisher

	África	Este de Asia	Sur de Asia	Europa
Este de Asia	$2,2 \times 10^{-16}$			
Sur de Asia	$2,2 \times 10^{-16}$	0,007936		
Europa	$2,2 \times 10^{-16}$	$2,1 \times 10^{-13}$	$8,0 \times 10^{-12}$	
Latinoamérica	$2,2 \times 10^{-16}$	0,03871	0,05248 (ns)	$1,0 \times 10^{-5}$

Los valores de las celdas corresponden a los valores p de la prueba de Fisher. ns: no significativo.



**Figura 2.**

Frecuencia del haplotipo de riesgo GA de los polimorfismos rs1554483 y rs4864548 en las 26 poblaciones de este estudio.

**DISCUSIÓN**

Entre los aspectos más relevantes que muestran los resultados está el hecho de que África presenta una baja frecuencia del haplotipo de riesgos GA (rs1554483G y rs4864548A), presentando la mayor frecuencia la población del Este Asiático. La heterogeneidad observada entre macropoblaciones, y que fue ratificada por la prueba exacta de Fisher y de equilibrio de Hardy-Weinberg, sugiere la existencia de factores microevolutivos en donde, probablemente, los patrones dietarios, la migra-

ción y el mestizaje entre poblaciones ancestrales han afectado a la variación de los alelos de estos loci en el presente.

La alta divergencia encontrada entre las macropoblaciones no se observa al comparar las frecuencias poblacionales dentro de ellas. Dicho de otra forma, la variación entre macropoblaciones es evidentemente mayor que la variación dentro de dichas macropoblaciones. Lo anterior puede explicarse si los factores microevolutivos operaron sobre el haplotipo GA durante la formación de las 5 poblaciones acá estudiadas, pero de manera menos intensa durante tiempos posteriores, durante la formación de las 26 poblaciones aquí abarcadas.

Una excepción al patrón previamente descrito es la alta divergencia entre las poblaciones de Lima y Puerto Rico *versus* las de Ciudad de México y Medellín. Dada la alta diferenciación entre esos dos pares de poblaciones latinoamericanas, nuestra hipótesis es la existencia de factores microevolutivos, muy probablemente incluyendo la selección natural, y de relativamente alta intensidad, ocurridos durante la formación de las poblaciones de Lima y Puerto Rico. Cabe señalar que la frecuencia de este haplotipo en el trabajo de Sookoian y cols. (12), en una muestra obtenida entre la población de Buenos Aires, fue del 43,3 %. Esta frecuencia es intermedia entre las reportadas aquí para las poblaciones latinoamericanas y muy cercana a la encontrada en la población de Ciudad de México.

La única población en la que se refutó el equilibrio de Hardy-Weinberg fue la esan (Nigeria). Como para esta población se detectó un déficit de heterocigosidad para ambos SNP ( $p_{\text{deficit}} = 0,015$ ), la causa más probable de la ausencia de equilibrio es la subdivisión poblacional (17) y no un fenómeno evolutivo relacionado con los loci aquí analizados.

En relación al alto desequilibrio de ligamiento encontrado en todas las macropoblaciones y poblaciones, es posible inferir que los haplotipos parentales (GA y CG) se encontrarán en alta frecuencia en relación a los haplotipos recombinantes (GG y AC) en cualquier otra población que se analice, a pesar de que la distancia física entre ellos es de 91986 bp (pares de bases nucleotídicas).

Los resultados obtenidos indican que, a nivel epidemiológico, el haplotipo GA tendría una relevancia heterogénea entre las diferentes macro poblaciones. Además, considerando que los resultados sugieren procesos evolutivos que han resultado en una alta diferenciación macropoblacional para este haplotipo, es plausible que otros loci asociados a la obesidad se distribuyan según el patrón macropoblacional aquí reportado. Posteriores estudios en donde se evalúe la asociación entre i) ancestría genética individual, segregada por las 5 macropoblaciones aquí analizadas, ii) susceptibilidad a la obesidad y iii) acumulación del haplotipo GA y otros alelos y haplotipos de riesgo, permitirían avanzar hacia la aplicación de herramientas genómicas personalizadas para evaluar tanto la susceptibilidad a la obesidad como la probabilidad de respuesta a las dietas bajas en carbohidratos.

Como línea de investigación posterior a este estudio, se propone analizar la asociación del haplotipo GA de los polimorfismos rs1554483 y rs4864548 en conjunto con los rs3749474, rs11932595 y rs6850524, ya que estos se han vinculado con el síndrome metabólico y sus componentes, como la hipertensión arterial, los niveles de triglicéridos y la respuesta a dietas bajas en carbohidratos (11,18).

## BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization (WHO). Disponible en: [www.who.int](http://www.who.int) (revisado el 16 de abril de 2022).
2. Barberio AM, Alareeki A, Viner B, Pader J, Vena JE, Arora P, et al. Central body fatness is a stronger predictor of cancer risk than overall body size. *Nat Commun* 2019;10:383. DOI: 10.1038/s41467-018-08159-w
3. Ladhani M, Craig JC, Irving M, Clayton PA, Wong G. Obesity and the risk of cardiovascular and all-cause mortality in chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transpl* 2017;32:439-49. DOI: 10.1093/ndt/gfw075
4. Wadolowska L, Hamulka J, Kowalkowska J, Kostecka M, Wadolowska K, Biezanowska-Kopec R, et al. Prudent-Active and Fast-Food-Sedentary/Dietary-Lifestyle Patterns: The Association with Adiposity, Nutrition Knowledge and Sociodemographic Factors in Polish Teenagers-The ABC of Healthy Eating Project. *Nutrients* 2018;10:1988. DOI: 10.3390/nu10121988
5. Sofer S, Eliraz A, Kaplan S, Voet H, Fink G, Kima T, et al. Greater weight loss and hormonal changes after 6 months diet with carbohydrates eaten mostly at dinner. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19:2006-14. DOI: 10.1038/oby.2011.48
6. Sofer S, Eliraz A, Kaplan S, Voet H, Fink G, Kima T, et al. Changes in daily leptin, ghrelin and adiponectin profiles following a diet with carbohydrates eaten at dinner in obese subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;23:744-50. DOI: 10.1016/j.numecd.2012.04.008
7. Alves RDM, de Oliveira FCE, Hermsdor HHM, Abete I, Zulet MA, Martínez JA, et al. Eating carbohydrate mostly at lunch and protein mostly at dinner within a covert hypocaloric diet influences morning glucose homeostasis in overweight/obese men. *Eur J Nutr* 2014;53:49-60. DOI: 10.1007/s00394-013-0497-7
8. Scheer FAJL, Morris CJ, Shea SA. The Internal Circadian Clock Increases Hunger and Appetite in the Evening Independent of Food Intake and Other Behaviors. *Obesity* 2013;21:421-3. DOI: 10.1002/oby.20351
9. Kiehn J-T, Tsang AH, Heyde I, Leinweber B, Kolbe I, Leliavski A, et al. Circadian Rhythms in Adipose Tissue Physiology. *Compr Physiol* 2017;7:383-427. DOI: 10.1002/cphy.c160017
10. 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). *European Journal of Human Genetics* 2009;18(3):364-9. DOI: 10.1038/ejhg.2009.176
11. Sookoian S, Fernández T, Bugueño A, Pirola C. Common genetic variations in CLOCK transcription factor are associated with nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology* 2007;13(31):4242. DOI: 10.3748/wjg.v13.i31.4242
12. Sookoian S, Gemma C, Gianotti T, Bugueño 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
13. Sookoian S, Gianotti TF, Bugueño A, Pirola CJ. Gene-gene interaction between serotonin transporter (slc6a4) and clock modulates the risk of metabolic syndrome in rotating shiftworkers. *Chronobiology International* DOI: 10.3109/07420528.2010.496913
14. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526(7571):68-74. DOI: 10.1038/nature15393
15. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria; 2016. Available from: <https://www.R-project.org/>
16. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers C, Banks E, DePristo M, et al. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 2011;27(15):2156-8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr330
17. Chen B, Cole JW, Grond-Ginsbach C. Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error. In: *Frontiers in Genetics (Vol. 8)*. Frontiers Media SA.; 2017. DOI: 10.3389/fgene.2017.00167
18. Cambor 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