



Clock genes. Circadian rhythms and predisposition to obesity

Title in Spanish: *Genes Clock. Ritmos circadianos y predisposición a obesidad*

Marta Garaulet Aza^{1*}, Purificación Gómez Abellán¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia e Instituto Biomédico de Investigación de Murcia (IMIB), Murcia, España.

ABSTRACT: Our physiology changes throughout the day and several physiological hormones display circadian rhythmicity. The alteration of this normal pattern is called chronodisruption (CD). In recent years it has been demonstrated that CD is related to obesity. Although several factors may be causing CD, one important aspect to consider is the failure in our internal clock. Indeed, studies performed in mutant animals have demonstrated that mutations in clock genes are related to obesity. In humans, mutations are rare (<1 % of the population). Nevertheless, it is rather common to have genetic variations in one single nucleotide (SNP) which underlie differences in our vulnerability to disease. Several SNPs in clock genes are related to obesity and weight loss. Taking into account that genetics is behind CD, the questions is: are we predestinated? We will see along these lines that nutrigenetics and epigenetics answer: "NO, we are not predestinated". Through nutrigenetics we know that our behaviours may interact with our genes and may decrease the deleterious effect of one specific risk variant. From epigenetics the message is even more positive: it is demonstrated that by changing our behaviours we can change our genome. Herein, we propose modifying "what, how, and when we eat" as an effective tool to decrease our genetic risk, and as a consequence to diminish CD and decrease obesity. This is a novel and very promising area in obesity prevention and treatment.

RESUMEN: Nuestra fisiología cambia durante el día y diversas hormonas muestran ritmicidad circadiana. La alteración de este patrón normal se denomina Cronodisrupción (CD). Recientemente se ha demostrado que la CD se relaciona con la obesidad. Aunque existen diversos factores que producen la CD, un aspecto importante a considerar es el fallo en nuestro reloj interno. Así, estudios realizados en animales de experimentación muestran que mutaciones en los genes reloj se asocian a la obesidad. En humanos estas mutaciones son poco frecuentes (<1 % de la población). Sin embargo, es bastante común tener variaciones genéticas en un solo nucleótido (SNP) que explican las diferencias en nuestra vulnerabilidad a la enfermedad. Se conocen varios SNPs en los genes reloj que se asocian a la obesidad y a la pérdida de peso. Teniendo en cuenta que la genética está detrás de la CD, la cuestión es: ¿estamos predestinados? A lo largo de estas líneas descubriremos cómo la respuesta nutrigenética y epigenética es: "NO, no estamos predestinados". A través de la nutrigenética sabemos que nuestros comportamientos pueden interactuar con nuestros genes y pueden disminuir el efecto nocivo de una variante de riesgo específico. A partir de la epigenética el mensaje es más positivo: al cambiar nuestros comportamientos podemos cambiar nuestro genoma. Según esto, proponemos modificar el "qué, cómo y cuándo comemos" como una herramienta eficaz para disminuir nuestro riesgo genético, y así disminuir la CD y la obesidad. Es por tanto esta un área muy novedosa y prometedora en la prevención y tratamiento de la obesidad.

*Corresponding Author: garaulet@um.es

Received: May 1, 2016 Accepted: July 1, 2016

An Real Acad Farm Vol. 82, Special Issue (2016), pp. 44-54

Language of Manuscript: Spanish

1. ¿QUÉ ES LA CRONOBIOLOGÍA?

Una de las características más evidentes de los seres vivos es la existencia de cambios rítmicos en su fisiología. En general, los organismos presentan un gran número de procesos que se producen de una manera periódica y previsible y que se pueden denominar «ritmos biológicos». La cronobiología, palabra derivada de tres términos griegos: *kronos* de 'tiempo', *bio* de 'vida' y *logos* de 'estudio', se define por tanto como la ciencia que estudia estos ritmos biológicos de los seres vivos.

Las primeras evidencias científicas de un ritmo biológico fueron proporcionadas por el astrónomo francés Jean Jacques d'Ortous DeMarian en 1729 (1), el cual

demonstró que los movimientos de apertura y cierre de las hojas de la planta *Mimosa pudica* se mantenían en condiciones de oscuridad constante durante varios días consecutivos. Posteriormente, Colin S. Pittendrigh (2) gracias al estudio de los ritmos biológicos de la mosca de la fruta *Drosophila*, descubrió los principios básicos en los que se basa la cronobiología moderna. En el ser humano, los primeros estudios de cronobiología, basados en los cambios a lo largo de las 24 horas del día (ritmos circadianos) de la temperatura corporal, los realizó en el siglo XIX el fisiólogo alemán L. Landois y fueron publicados por primera vez en el libro *Text book of human physiology* (1885), en el que escribió: «Por lo general, la

temperatura sube de un modo constante durante el día, hasta alcanzar su máximo de cinco a ocho de la tarde, y disminuye por la noche para llegar a su mínimo de dos a seis de la mañana». Hoy en día la temperatura corporal se utiliza como un importante marcador del sistema circadiano humano.

Desde hace años, además, se sabe que en el ser humano múltiples variables fisiológicas, aparte de la temperatura, presentan variaciones a lo largo del día. Por ejemplo, existen ritmos circadianos en el sistema de corticoides, de tal manera que éstos alcanzan su máxima producción o acrofase al inicio de la mañana, mientras que sus concentraciones plasmáticas disminuyen a lo largo del día para conseguir su nadir (o mínimo valor) antes de que el individuo se acueste. Otros ejemplos de ritmos de 24 horas en hormonas son los cambios en insulina, leptina, hormona del crecimiento o melatonina, entre otras. En este sentido, el conocimiento de las variaciones diarias de las diferentes hormonas y parámetros clínicos es de crucial importancia para el entendimiento del ser humano y en general del ser vivo.

2. ¿QUIÉN ORQUESTA ESTA VARIABILIDAD DE HORARIOS? ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA CIRCADIANO

El sistema circadiano de los humanos está compuesto por una red de estructuras jerárquicamente organizadas responsables de la generación de ritmos circadianos y de su sincronización con el entorno. Desde 1972 se conoce la existencia de un *reloj central* localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, que en condiciones ambientales naturales se «reajusta» cada día mediante una señal periódica de luz/oscuridad a través de los ojos. Aunque la luz (cambios luz/oscuridad) sea la principal señal entrante al NSQ, existen otras entradas periódicas, como son el horario de las comidas (cambios ingesta/ayuno) y el ejercicio programado (cambios actividad/reposo), capaces de poner en hora el sistema circadiano. Estos dos sincronizadores externos, la hora de la comida y del ejercicio, parecen influir principalmente a otros relojes que se encuentran en otros órganos de nuestro cuerpo. De hecho, desde el año 2001 conocemos que el marcapasos central, a su vez, sincroniza la actividad de varios relojes periféricos presentes en la mayor parte de nuestros órganos y tejidos tales como en el corazón, el pulmón, el páncreas y el tejido adiposo, entre otros, mediante la secreción cíclica de hormonas y la actividad del sistema nervioso vegetativo.

Además del descubrimiento de los *relojes periféricos*, se ha producido un enorme progreso en las dos últimas décadas en las técnicas bioquímicas y genéticas, que han contribuido al avance sustancial del conocimiento de las bases moleculares de la ritmicidad en los seres vivos. Es por ello que hoy en día se sabe que en los mamíferos, los componentes básicos de la maquinaria del reloj molecular operan en casi todas las células del cuerpo a través de una compleja red de bucles de transcripción-traducción y son capaces de modular la expresión de genes específicos y de sus productos con oscilaciones de 24 horas. Entre estos

genes reloj o *genes clock* se encuentran los conocidos como elementos positivos, *CLOCK* y *BMAL1*, que forman heterodímeros (*CLOCK-BMAL1*) y activan la transcripción de otros genes o elementos negativos, *PER* (Periodo 1, 2 y 3) y *CRY* (Criptocromo 1 y 2). Las proteínas resultantes *PER* y *CRY* se translocan de nuevo al núcleo e inhiben la actividad de *CLOCK-BMAL1*, por lo que presentan una función reguladora negativa (3). Además, estos relojes circadianos celulares son capaces de modular la expresión de múltiples genes dando lugar a importantes variaciones en la fisiología de la célula a lo largo de 24 h.

3. CUANDO EL SISTEMA CIRCADIANO FUNCIONA MAL: CRONODISRUPCIÓN

Durante estos últimos años en la ciencia de la cronobiología se ha introducido un nuevo término, la Cronodisrupción (CD) o interrupción circadiana, que se puede definir como la perturbación del orden temporal interno de los ritmos circadianos fisiológicos, bioquímicos y comportamentales (4). También se podría definir como la ruptura de la sincronización entre los ritmos circadianos internos y los ciclos de 24 horas medioambientales.

3.1. Cronodisrupción y enfermedad

Los resultados científicos actuales sugieren que la CD está estrechamente asociada con un aumento del riesgo de desarrollar ciertas enfermedades o un empeoramiento de patologías preexistentes, como el envejecimiento prematuro, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares o la obesidad (5).

Envejecimiento prematuro. El funcionamiento del sistema circadiano se ve afectado por la edad. Se ha demostrado que en edades avanzadas los ritmos circadianos se caracterizan por poseer la fase anticipada, una amplitud reducida, un empeoramiento de la habilidad de resincronización después de un cambio horario y una desincronización interna entre diferentes ritmos. Además, determinados estudios indican que la CD tiene un efecto directo sobre la aceleración del envejecimiento. Es por ello que la interrupción de los ritmos circadianos parece reducir las expectativas de vida, mientras que un funcionamiento correcto permite un aumento de la longevidad.

Cáncer. Estudios realizados tanto en animales como en seres humanos han documentado que una de las consecuencias de la CD es la iniciación y el desarrollo de cáncer. De hecho, se ha estudiado en humanos una relación entre la CD y el diagnóstico del cáncer. En pacientes con cáncer colorrectal, se ha asociado el hecho de poseer ritmos bien marcados con una mejor calidad de vida, mejor respuesta a la quimioterapia y mayor supervivencia.

Enfermedades cardiovasculares. El patrón circadiano normal de presión arterial se caracteriza por presentar los valores más bajos durante la noche y un máximo por la mañana coincidiendo con la hora del despertar de los individuos (dipper). Así, hoy en día se sabe que el mejor indicador para predecir el riesgo de infarto de miocardio es la presencia de valores de presión arterial elevados durante

la noche. Existen casos en los que los valores de presión arterial no se reducen por la noche todo lo esperado y son similares a los valores diurnos. Se ha observado que este patrón de presión arterial, denominado “no dipper”, es característico de trabajadores por turnos o personas ancianas que presentan una alteración de los ritmos circadianos.

Obesidad. Recientes estudios han mostrado que la obesidad se asocia con la alteración de los ritmos diarios. Muchas de las funciones del sistema circadiano relacionadas con el metabolismo –como la regulación metabólica de lípidos y glucosa o la respuesta a la insulina– pueden verse perjudicadas por la CD, contribuyendo a la fisiopatología de la obesidad. A continuación profundizaremos en la relación entre CD y obesidad.

4. CRONODISRUPCIÓN Y OBESIDAD: EVIDENCIAS DE ESTA INTERESANTE RELACIÓN

La obesidad se ha convertido en uno de los problemas más graves de salud pública en el siglo XXI y la morbilidad y mortalidad asociada a la obesidad continúa en aumento. Existen factores exógenos como por ejemplo tener un trabajo a turnos, o factores endógenos como es la genética, que presentan un papel importante en el desarrollo y en el tratamiento de la obesidad.

4.1. Factores exógenos: horarios de comida como sincronizador del reloj circadiano

En humanos los hábitos sociales actuales, tales como la reducción del tiempo de sueño, la irregularidad interdiaria del sueño-vigilia causado por el jet-lag, el trabajo por turnos, el aumento de la exposición a la luz brillante durante la noche, o el elevado consumo de “snacks”, son todos ellos factores que actúan sobre el cerebro induciendo una pérdida de la “percepción” de los ritmos internos y externos.

Es bien sabido que un horario regular de comidas ayuda a mantener el orden temporal interno del sistema circadiano, pero la sociedad actual de 24 h en la que vivimos hace que con frecuencia abandonemos estos patrones, no solo por el trabajo a turnos y el jet-lag, sino también y sobre todo en jóvenes, debido a las horas de estudio, de ocio y de placer, lo que se conoce como el «jet-lag social».

Paralelamente al incremento de la obesidad en los

últimos años la proporción de adultos en EEUU que se salta el desayuno ha aumentado de un 14 a un 25 % en el periodo de 26 años transcurrido entre 1965 y 1991 (6), lo cual plantea la cuestión de si podría haber una relación causal del horario de la comida en la obesidad. Así, durante años ha habido una creencia popular que defendía que saltarse el desayuno y trasladar la ingesta energética hacia la tarde-noche, suponía un aumento de la obesidad. Sin embargo, no ha sido hasta estos últimos años cuando la ciencia ha empezado a demostrar que el momento de la ingesta es un factor clave en la obesidad, independientemente de la ingesta calórica diaria.

Un estudio que ha resultado de relevancia en este campo ha sido el estudio longitudinal realizado por nuestro grupo de investigación en colaboración con el grupo de sueño de la Universidad de Harvard y la Universidad de Tufts, y publicado en 2013 en la revista *International Journal of Obesity* (7). En él hemos demostrado que en España, el momento de la comida principal del día era predictivo de la pérdida de peso. En esta población, comer después de las tres de la tarde, resultaba en una pérdida de peso menor que la de aquellos que comían antes de las tres. Estos resultados se mostraron en 420 personas obesas y con sobrepeso durante una intervención dietética de 20 semanas y resultó que este efecto era independiente de la ingesta total de calorías (**Figura 1**).

La importancia de este trabajo radica en que es el primero en demostrar que no solo «qué» comemos sino también «cuándo» lo hacemos es decisivo en la pérdida de peso. Además, los resultados previos fueron sorprendentes ya que tanto los comedores tempranos (antes de las tres) como los tardíos (después) presentaron ingestas y gastos energéticos semejantes, lo que hace necesario encontrar una explicación metabólica a estos resultados, así como tratar de explicar su conexión con el horario del tejido adiposo, órgano a partir del cual se moviliza la grasa corporal en la pérdida de peso. El hecho de haber demostrado previamente la existencia de un reloj periférico en el tejido adiposo (8), en el que el horario de máxima expresión de los genes más relevantes difiere en los distintos momentos del día nos hace pensar que el horario de comida pueda afectar a la diferente movilización o acúmulo de grasa en el tejido adiposo, y como consecuencia a la eficacia en la pérdida de peso.

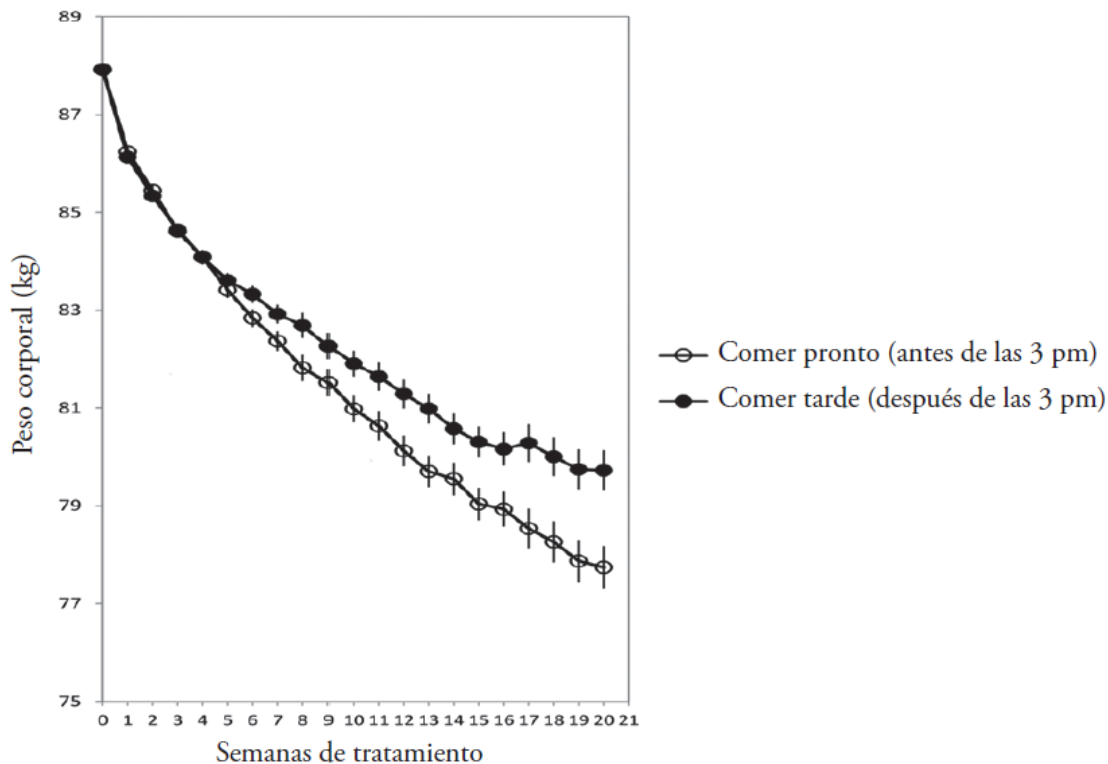


Figura 1. Diferencias en la pérdida de peso durante 20 semanas de tratamiento entre comedores tempranos (antes de las 3 pm) y comedores tardíos (después de las 3 pm). Fuente (7).

Estudios experimentales

En el año 2009, los datos experimentales en animales mostraron que la inversión del ciclo de alimentación/ayuno, sin cambios en la ingesta calórica total, provocaba un aumento dramático de la ganancia de peso con una dieta de alto contenido graso, resultados que fueron confirmados en estudios posteriores usando diferentes modelos animales y diferentes diseños de estudio. También en el año 2009, datos experimentales en humanos en condiciones controladas de laboratorio (incluyendo una dieta isocalórica) mostraron que comer durante la noche y ayunar durante el día se acompañaba de una alteración de la tolerancia a la glucosa y una disminución de las concentraciones plasmáticas de la hormona de la saciedad, leptina.

Estudios de intervención en humanos

Por otro lado, también cambios más sutiles en el horario de las comidas, es decir, en la distribución de la ingesta calórica durante un periodo normal de vigilia, parece influir en el éxito de la terapia de la pérdida de peso. Por ejemplo, un reciente estudio experimental de 12 semanas de duración ha mostrado que los sujetos a los que se les asignaba una alta ingesta de calorías durante el desayuno (aprox. 700 kcal) perdían significativamente más peso que aquellos a los que se les asignaba un alto consumo de calorías durante la cena (también 700 kcal) (9).

Con el fin de profundizar en el mecanismo implicado en estos resultados, nuestro grupo de investigación ha

llevado a cabo un estudio en mujeres sanas (10) en el que se las sometía a dos condiciones: a) comer a las 13:00 h y b) comer a las 16:30 h, en ambas situaciones la dieta ingerida fue la misma. Nuestros resultados mostraron la existencia de cambios en el patrón circadiano de la temperatura corporal medida en la muñeca, con un aplanamiento del segundo armónico correspondiente a la hora de la siesta (previamente asociado con la obesidad) y también un aplanamiento del patrón de secreción de cortisol para la condición de comer tarde (previamente asociado con situaciones de estrés). Respecto a la tolerancia a la glucosa, comer tarde en la comida principal resultó en un aumento del área bajo la curva en un 46 % en comparación con aquellos que comían temprano, mostrando una menor tolerancia a la glucosa. Además, comer tarde dio lugar a un cociente respiratorio menor, lo que indica una menor utilización de hidratos de carbono y también un menor gasto de energía basal que cuando se comía temprano. Todos estos resultados podrían explicar en parte por qué comer tarde se asocia con alteraciones metabólicas propias de la obesidad y con una menor pérdida de peso corporal (10).

4.2. Factores exógenos: Horario de la actividad física como sincronizador del reloj circadiano

Durante décadas se ha investigado el papel de la actividad física como sincronizador externo de nuestro sistema circadiano, así diversos trabajos realizados en los años 70 del pasado siglo, vinculaban la variación diurna de la presión arterial con la actividad física en humanos. Sin embargo, hasta hace poco se desconocía qué momento del

día era el más adecuado para realizar actividad física con el fin de mantener una buena salud del sistema circadiano. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha estudiado la influencia de la actividad física realizada por la mañana o por la tarde sobre la ritmicidad circadiana, mediante el estudio de la temperatura corporal, considerada un marcador para evaluar el ritmo circadiano y para identificar sus posibles trastornos.

Los participantes realizaron actividad física controlada (45 minutos de carrera continua) durante 7 días por la mañana y otra semana por la tarde (los resultados se compararon con una semana control en la que no se realizó actividad). El trabajo mostró que, en base a los efectos observados en el ritmo circadiano, la realización de la actividad física intensa durante la noche podría no ser tan beneficiosa como la actividad realizada durante la mañana (11).

4.3. Factores endógenos

Existen otros factores endógenos o internos, y estos producen CD por la alteración de la maquinaria central del reloj circadiano molecular. Las proteínas reloj BMAL1, PER2 y CLOCK, entre otras, tienen un papel específico en nuestra fisiología, así como en el funcionamiento del reloj circadiano molecular. Fallos en estas proteínas o en los genes reloj asociados a ellas pueden producir la CD.

Fallos en el reloj central: Mutaciones en animales de experimentación

En relación a los genes reloj, numerosos estudios realizados en animales de experimentación con mutaciones en los genes reloj han demostrado la relación entre estas mutaciones y futuros fallos en el sistema circadiano y el desarrollo de enfermedad. En este sentido, los animales con mutaciones en los genes reloj mostraron mayor riesgo de desarrollar ciertas enfermedades como problemas cardiovasculares, cáncer u obesidad (5).

Uno de los primeros estudios que mostró el efecto de las mutaciones genéticas y la enfermedad crónica fue el dirigido por Turek *y cols.* en 2005 (12). Este estudio demostró que los ratones mutantes knock-out homocigóticos para *Clock* presentaban alterados los ritmos de ingesta siendo hiperfágicos y obesos, y además desarrollaban Síndrome Metabólico (SMet) caracterizado por hiperleptinemia, hiperlipidemia, esteatosis hepática, hiperglucemia e hipoinsulinemia. Este estudio fue crucial para el conocimiento de la relación entre obesidad y cronodisrupción, y ha constituido la base de estudios posteriores tanto fisiológicos como clínicos y epidemiológicos sobre obesidad, SMet y cronobiología. Sin embargo, en este sentido existe cierta controversia entre diferentes estudios. Por ejemplo, Kennaway *y cols.* mostraron que la mutación (Delta19) del gen *Clock* en este caso no producía obesidad, si no que por el contrario, los autores encontraron una cantidad reducida de ácidos grasos libres en plasma y una elevada sensibilidad a la insulina, junto a una elevación de la adiponectina plasmática, siendo ésta una citoquina anti-inflamatoria y protectora (13).

Otros estudios indican que determinadas mutaciones en los genes reloj se relacionan con un elevado riesgo de padecer ciertas enfermedades, como el envejecimiento prematuro, demostrado por Kondratov *y cols.* (14). En este estudio, los ratones *Bmal1* (-/-) tuvieron una menor esperanza de vida (esperanza de vida media de los animales silvestres) y presentaron varios síntomas de envejecimiento prematuro, como sarcopenia, alteración de los porcentajes de linfocitos o empeoramiento de visión entre otros (14).

5. OBESIDAD Y GENES RELOJ

En humanos las mutaciones son muy raras y poco frecuentes. Sin embargo, es mucho más común tener variaciones genéticas en un solo nucleótido (SNP) en una posición específica del genoma. Estas variaciones están presentes en más del 1 % de la población general y en ellas subyacen las diferencias en nuestra vulnerabilidad a ciertas enfermedades como la obesidad.

5.1. Gen *CLOCK*

En este sentido, Sookoian *y cols.* en 2008 publicaron por vez primera que las diferentes variantes del gen *CLOCK* se asociaban con la obesidad, especialmente con la obesidad abdominal (15). Además, Scott *y cols.* en el mismo año confirmaron esta hipótesis al demostrar que una variante génica *CLOCK* podría desempeñar un papel en el desarrollo del síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (16).

Posteriormente, nuestro grupo de investigación replicó los resultados de Sookoian y Scott y además demostramos que diferentes variantes genéticas de los genes reloj se relacionaban con la obesidad y otras enfermedades relacionadas, tales como el síndrome metabólico. Por ejemplo, determinados SNPs del gen *CLOCK* (rs3749474, rs4580704 y rs1801260 (3111T>C)) se asociaron con el índice de masa corporal (IMC), consumo de energía, y diferentes variables relacionadas con la obesidad (17). De hecho, nuestros resultados mostraron, en general, que los portadores de los alelos menores comieron más, comieron más grasa, y eran más obesos. Por otro lado, los portadores del alelo menor (A) de *CLOCK* rs4580704 tenían un menor riesgo de desarrollar diabetes (31 % menor) e hipertensión (46 % menor) que los no portadores (17). Además, la variante genética de *CLOCK* rs1801260 (3111T>C) se asoció con un aumento de obesidad y con una menor pérdida de peso (18). Por otra parte, la proporción de sujetos que dormían menos de 6 horas por día fue mayor entre los sujetos con la variante menor C de este polimorfismo que los no portadores (59 % vs. 41 %) (19). Algunas de estas asociaciones se explican funcionalmente por la presencia de un polimorfismo que implica un cambio en la estructura del ARNm que conduce a su vez a un cambio en la expresión génica, este es el caso del polimorfismo del gen reloj *CLOCK* rs3749474 (20). La mayoría de estos nuevos resultados se replicaron en dos poblaciones diferentes (Mediterránea y de América del Norte) con diferentes antecedentes genéticos y hábitos

dietéticos, haciendo así hincapié en la solidez de los resultados.

5.2. Gen *REV-ERB ALFA*

Otros resultados de nuestro grupo y del grupo de Nutrición y Genética de Tufts muestran cómo una variante génica en *REVERBα* rs2071427 se asocia con obesidad en dos poblaciones diferentes, una norteamericana y otra mediterránea (21). Este gen es considerado el nexo molecular entre el elemento positivo del reloj, que aumenta su actividad y que está constituido por el dímero *CLOCK* y *BMAL1*; y el elemento negativo (*PER* y *CRY*), que enlentece el funcionamiento del reloj. El interés de *REV-ERBα* rs2071427 radica en que su asociación con la obesidad se debe a una disminución de la actividad física, y no a un aumento de la ingesta, como sucede con la mayoría de los genes reloj (21). De hecho, nuestros resultados son semejantes a los obtenidos en animales de experimentación que muestran que aquellos ratones que presentan una mutación en este gen, presentan una disminución en la movilidad locomotora espontánea respecto a aquellos animales silvestres (22).

5.3. Gen *PERIODO*

Nuestro grupo de investigación también ha encontrado asociaciones significativas entre los elementos negativos de los genes reloj de nuestro sistema circadiano y varios comportamientos obesogénicos. En este sentido, un gen reloj clave es el gen *PERIODO2* (*PER2*). En humanos, una mutación sin sentido en *PER2* se ha relacionado con varias alteraciones psicológicas, tales como las variaciones estacionales en el estado de ánimo y comportamiento, o la depresión de invierno (23). Nuestro grupo fue el primero en demostrar que algunos SNPs específicos de *PER2* (rs2304672C>G y rs4663302C>T) se asociaban con la obesidad abdominal (24). En particular, los portadores del alelo menor G de *PER2* rs2304672C>G (6 % de la población) mostraron comportamientos obesogénicos como un mayor abandono del tratamiento de pérdida de peso, un aumento de la frecuencia de picoteo, un mayor estrés por la dieta, comer mientras se está aburrido o saltarse el desayuno, en comparación con los no-portadores C (24). Es impresionante observar cómo un pequeño cambio en nuestro genoma (una citosina por una guanina) puede producir una gran variación en la estructura del ARNm y, como consecuencia, producir cambios en nuestra expresión génica.

6. PÉRDIDA DE PESO Y GENES RELOJ

Actualmente uno de los mayores retos en los tratamientos de pérdida de peso es poder detectar factores predictivos de éxito. El análisis de la interacción entre los genes, la dieta y las conductas podría ayudar a la detección precoz del éxito de dichos tratamientos. Por otro lado está descrito que la genética está detrás de nuestra maquinaria circadiana. El polimorfismo del *CLOCK* 3111T>C se ha relacionado con anterioridad con obesidad y pérdida peso.

Con el fin de tener un mayor conocimiento sobre la relación entre los ritmos circadianos y la obesidad, nuestro

grupo de investigación llevó a cabo los siguientes estudios: se determinó las posibles diferencias en la ritmicidad circadiana del polimorfismo *CLOCK* 3111T>C en mujeres con sobrepeso, mediante la evaluación de la temperatura periférica, actimetría y posición (25). Nuestros resultados mostraron que los pacientes con el alelo menor C presentaban alteraciones circadianas: menor amplitud y una mayor fragmentación del ritmo, un patrón circadiano menos estable, y una función circadiana debilitada significativamente, según la evaluación del índice de funcionalidad circadiana (CIF), en comparación con los sujetos TT, que mostraron perfiles del ritmo circadiano más robustos. Además los portadores C eran menos activos, iniciando sus actividades más tarde en la mañana y presentando mayor somnolencia durante el día, mostrando una acrofase retrasada característica de los individuos vespertinos (25).

Posteriormente, nos planteamos si los ritmos circadianos podrían ser factores predictivos de la efectividad de los tratamientos de pérdida de peso (26). Nuestros resultados mostraron que aquellos individuos menos respondedores a un tratamiento de pérdida de peso presentaban un patrón circadiano de temperatura periférica más aplanado, caracterizado por una menor amplitud, una mayor variabilidad intradiaria, y un índice de funcionalidad circadiana deteriorado, si los comparábamos con los individuos que presentaron una mayor respuesta al tratamiento. Además se encontraron diferencias significativas para los valores medios de la posición del cuerpo, presentando los bajos respondedores posiciones más tumbadas en comparación con aquellos individuos que presentaron una mayor respuesta al tratamiento (26).

7. INTERACCIONES GEN-AMBIENTE PARA LA OBESIDAD

Los genes reloj pueden también *interactuar* con el ambiente para la obesidad. Este es el caso de aquellos comportamientos directamente relacionados con las emociones en relación con la comida. Por ejemplo, buscar refugio en los alimentos (especialmente alimentos muy calóricos) es una estrategia muy común para reducir la ansiedad, la tristeza y las emociones negativas que se producen cuando se sigue una dieta a largo plazo o cuando surgen circunstancias difíciles en nuestra vida cotidiana. En este sentido, nuestros resultados mostraron que durante un tratamiento de pérdida de peso aquellos individuos que a) eran portadores del alelo de riesgo C del SNP 3111T>C del gen *CLOCK* y que además b) mostraron comportamientos emocionales relacionados con la comida, presentaron más dificultades para bajar el peso durante el tratamiento. Curiosamente, los portadores C que no mostraron comportamientos emocionales, a pesar de tener un riesgo potencial debido a sus antecedentes genéticos, mostraron una pérdida de peso similar a los portadores TT (alelo protector). Estos resultados son alentadores porque demuestran que, cambiando el "cómo" comemos, podemos reducir o incluso eliminar el efecto nocivo de una variante genética.

En este sentido, nuestro grupo de investigación ha

desarrollado un cuestionario de diez preguntas denominado Cuestionario del Comedor Emocional (EEQ), que clasifica a los individuos obesos en función de la relación entre la ingesta de alimentos y las emociones para ser utilizados en la práctica clínica. El cuestionario permite clasificar a los pacientes como: comedores no emocionales (las emociones tienen que ver poco o nada con su conducta alimentaria) y comedores emocionales (los sentimientos y emociones afectan su alimentación como respuesta a emociones negativas, como la ansiedad, depresión, ira o la soledad).

De una población total de 1.500 sujetos, se encontró que el 60 % eran comedores emocionales, el 40 % eran portadores del alelo menor C y el 30 % presentaban ambas características, es decir eran a) portadores C y b) comedores emocionales. Teniendo en cuenta estos resultados, puede ser muy útil desarrollar programas cognitivos y de comportamiento dirigidos a reducir la frecuencia de episodios de alimentación emocional, particularmente para este 30 % que presentan conductas emocionales con la comida y además son portadores de la variante de riesgo C. Estos resultados son alentadores y deben utilizarse en la práctica clínica.

Otros ejemplos de interacción gen reloj ambiente para la obesidad son las que existen entre varios SNPs del gen *CLOCK* y las características de la dieta para diferentes rasgos del SMet. Nuestros resultados mostraron la existencia de una interacción significativa entre la variante génica rs4580704 del gen *CLOCK* y la ingesta de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) para los valores de glucosa en plasma y la sensibilidad a la insulina: “el efecto positivo del alelo menor en la sensibilidad a la insulina estuvo solamente presente cuando la ingesta de AGM fue mayor al 13 % de la energía”. Además encontramos diferentes efectos a lo largo de los genotipos *CLOCK* 3111T>C para la ingesta de ácidos grasos saturados (% de energía). “Los efectos deletéreos de la variante de riesgo C sobre obesidad se encontraron sólo cuando los sujetos presentaron ingestas de grasas saturadas superiores al 12 %” (17).

Más recientemente, un estudio desarrollado por nuestro grupo demostró una nueva interacción del gen reloj *CRY* y las características de la dieta para la resistencia a la insulina en una población mediterránea, resultados que también se replicaron en una población de Norte América (27). Los resultados del meta-análisis indicaron que “un incremento en la ingesta de carbohidratos se asoció con un aumento en el HOMA-IR (índice de resistencia a la insulina) y en una disminución del QUICKI (índice de sensibilidad a la insulina), sólo en los individuos homocigóticos para el alelo menor C en el polimorfismo rs2287161 del gen *CRY1*” (27). Los genes *CRYs* (elementos negativos del reloj central) están implicados en la regulación del metabolismo de la glucosa. Estudios en animales de experimentación han demostrado que la gluconeogénesis puede ser modulada por cambios circadianos en la expresión hepática del *Cry* (28). Por lo tanto, “los factores que afectan a la expresión del *CRY*

podrían perjudicar la regulación de la homeostasis de la glucosa y por ello incrementar el riesgo de diabetes en humanos” (27).

Estos resultados pueden ayudarnos a diseñar programas dietéticos más efectivos: para aquellas personas que son portadoras CC de la variante génica del gen *CRY* rs2287161, nuestro consejo estaría centrado en ayudarlas en la reducción de la ingesta de carbohidratos, así su riesgo de HOMA podría ser incluso más bajo que el de los portadores del alelo G.

Otro ejemplo, pero esta vez de interacción entre gen y medicamento, está relacionado con la variante rs10830963 del receptor 1 B de melatonina (*MTNR1B*). La variante de riesgo G del *MTNR1B* rs10830963 empeora el efecto de la melatonina exógena en la tolerancia a la glucosa, por lo que los portadores del alelo G deberían evitar tomar alimentos junto con la administración de melatonina exógena (29). Estos resultados podrían afectar a aquellos sujetos que toman melatonina (por ejemplo para problemas de sueño, pero que también son portadores del alelo de riesgo G quienes toman comida (cenan) junto con elevados valores de melatonina endógena, como pasa en los comedores tardíos naturales o en los trabajadores por turnos). Nuevos estudios deberían responder cuestiones más específicas sobre el horario de las comidas, las variantes génicas de riesgo y la resistencia a insulina.

8. LA EPIGENÉTICA DICE: PODEMOS CAMBIAR NUESTRO GENOMA CON NUESTROS HÁBITOS

La epigenética defiende que el código genético no es el único determinante del fenotipo del individuo, sino que es la disposición en el espacio del ADN lo que hace que se expresen o no ciertos genes. Metilaciones en citosina en ciertas regiones del gen llamadas CpG (regiones del ADN donde el nucleótido de citosina se encuentra próximo al de guanina unidos por un fosfato), dan lugar a una especie de «gorros químicos» que la mayoría de las veces impiden la expresión del gen. Lo interesante de estas metilaciones es que se producen incluso en la edad adulta, y que pueden ser consecuencia de la dieta y de otras conductas. Por lo tanto, si hacemos cambios en estas conductas podemos desmetilar/metilar ciertos genes y modular su expresión. La conexión entre la epigenética y la maquinaria del reloj surgió por primera vez con el estudio de Crosio y *cols.* quienes demostraron que la remodelación de la cromatina estaba involucrada en la expresión de los genes reloj (30). Estos autores mostraron que un pulso de luz, cuando se aplica a los ratones durante la noche, induce a la fosforilación de histonas en el núcleo supraquiasmático (NSQ) lo que implica una inducción de la traducción del gen *PER1*. Posteriormente, se ha indicado que las modificaciones de histonas en los promotores de genes controlados por el reloj ocurren de manera circadiana.

En este sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado por primera vez (31) que el estado de metilación de sitios CpG localizados en los genes reloj (*CLOCK*, *BMAL1* y *PER2*) se asocia con el grado de obesidad, con las alteraciones propias del síndrome

metabólico y con la pérdida de peso. Por ello, proponemos que el estado de metilación de los distintos sitios CpG en *CLOCK* y *PER2* podría ser utilizado como biomarcador de éxito de pérdida de peso (31).

Más recientemente, nuestra investigación demostró que la intervención nutricional de pérdida de peso modifica el patrón de metilación de los genes reloj *BMALI*, *CLOCK* y *NR1D1* en sangre. Estos cambios en el grado de metilación de *BMALI* con el tratamiento se asociaron con una reducción en los parámetros de riesgo metabólico, como por ejemplo, en las concentraciones lipídicas en el suero (32). Curiosamente, individuos de cronotipo nocturno se beneficiaron más del tratamiento en lo que se refiere a los cambios epigenéticos producidos, que los individuos matutinos o diurnos. Por otra parte, la metilación de *BMALI* aumentaba con el aumento de la ingesta de energía y de carbohidratos, lo que sugiere que las intervenciones nutricionales focalizadas en la reducción del consumo de energía y de carbohidratos pueden ayudar a disminuir la vulnerabilidad a la CD y la obesidad, especialmente en los sujetos vespertinos, a través de cambios epigenéticos (32).

9. DETECCIÓN DE LA CRONODISRUCCIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

A diferencia de lo que sucede en otras ciencias, en cronobiología el tiempo es la clave. Por tanto, es necesario determinar las variables fisiológicas clásicas desde una nueva perspectiva. En este sentido, no basta con la determinación basal en ayunas, sino que se hace necesario realizar distintas determinaciones a lo largo de las 24 horas, y por ello ante una variable rítmica la influencia de los intervalos de muestreo es crucial. Entre las variables utilizadas para determinar la cronobiología de un individuo, destacan la temperatura corporal (tanto central como periférica), la presión arterial y la secreción de la mayoría de hormonas, en especial la melatonina y el cortisol. Todas estas variables presentan ritmos robustos y precisos, y constituyen buenos indicadores del funcionamiento del sistema circadiano. Si es técnicamente posible, lo ideal es que se registren simultáneamente dos o más ritmos marcadores de un mismo organismo.

Nuestro grupo de investigación ha ensayado técnicas no invasivas y fáciles de medir para tratar de detectar la CD en los pacientes con obesidad. Nuestros resultados muestran que un registro de la temperatura periférica junto con dos cuestiones de inicio y final del sueño y una medida de cortisol salival por la mañana, podrían ser suficientes para caracterizar la cronobiología de la obesidad (33).

9.1. Determinación de la temperatura periférica

Para medir la temperatura periférica se utilizan los iButton® (Thermochron®). Básicamente se trata de un chip encapsulado en acero inoxidable que se coloca en la muñeca del paciente y se sujeta con una muñequera. La memoria de este chip admite hasta 2.500 datos. Tras esta determinación, se detecta la variación circadiana de la temperatura periférica y mediante el análisis del ritmo (amplitud, acrofase, mesor, variabilidad intradiaria, etc.) se puede estudiar si este es saludable o no.

9.2. Medición del cortisol salival

Estudios previos indican que la medición de cortisol salival es una alternativa válida a las mediciones de cortisol en plasma. Además, las muestras salivales se obtienen mediante un procedimiento no invasivo, libre de estrés, y son más fáciles de recoger con salivettes, incluso en casa, lo que evita muchos problemas, tales como la falta de personal cualificado. Los resultados previos de nuestro grupo han demostrado un aplanamiento de los ritmos circadianos del cortisol con la obesidad (34). Junto a estas ventajas, las muestras salivales son particularmente convenientes para los estudios de cronobiología, ya que pueden ser recogidas muchas veces al día y pueden proporcionar importante información sobre el sistema circadiano.

En cronobiología se suelen tomar al menos tres muestras de saliva para la determinación del cortisol: por la mañana, después de comer y por la noche (35). Sin embargo, los resultados obtenidos por nuestro equipo indican que la muestra de cortisol tomada por la mañana presenta una mayor importancia estadística, lo que sugiere que en la práctica clínica esta primera muestra tomada por la mañana podría ser la más útil (33).

9.3. Registro del sueño

Nuestra experiencia muestra que en la práctica clínica, en lugar de tener que completar complicados diarios de sueño, sólo sería necesario que el paciente registrara la hora de inicio del sueño y la hora de despertar. Un retraso en la hora habitual de irse a dormir se considera un importante cronodisruptor.

9.4. Desarrollo de un índice de Cronodisrupción

Con todos estos datos, se calcula un índice de CD según el cual los pacientes se podrían dividir en dos poblaciones en función de sus alteraciones circadianas (**Figura 2**) (33).

CRONODISRUPCIÓN

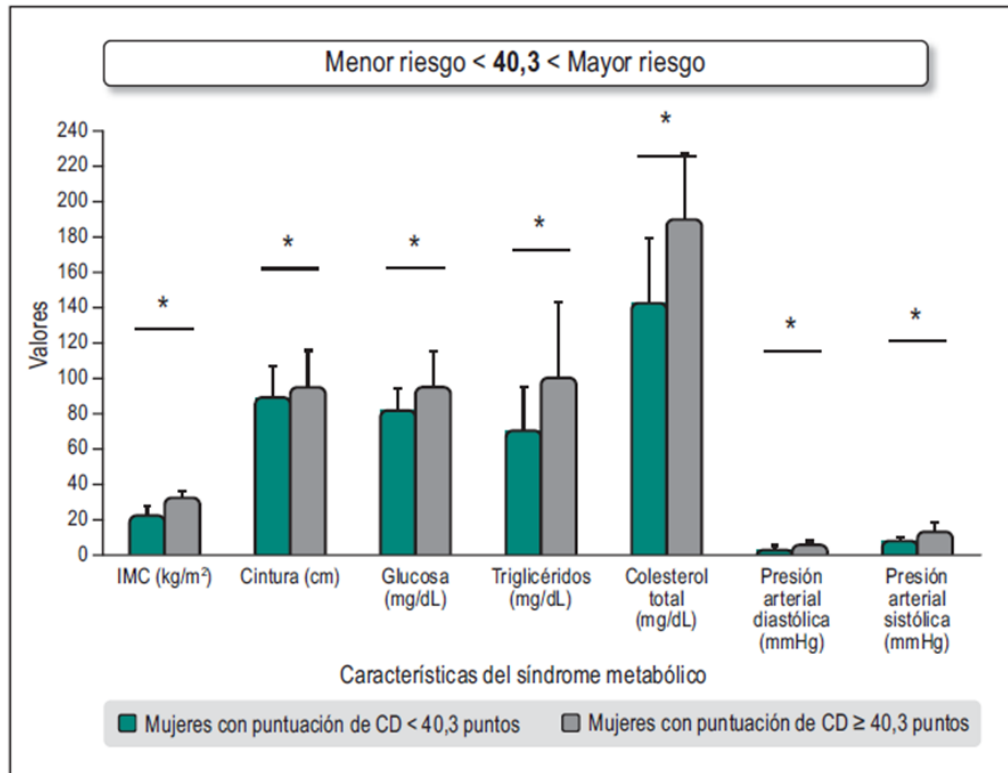


Figura 2. Cronodisrupción (CD) y síndrome metabólico. Aquellos individuos que tienen este valor por encima de 40,3 presentan CD, mientras que los que lo tienen por debajo no presentan alteraciones cronobiológicas. Fuente (33).

Así, aquellos individuos que tienen este valor por encima de 40,3 presentan CD, mientras que los que lo tienen por debajo no presentan alteraciones cronobiológicas (33). Además, aquellos individuos que tienen CD son también los que presentan un aumento de los diversos componentes del síndrome metabólico. Es importante resaltar que este índice se ha desarrollado en personas normopeso o con obesidad moderada, por lo que serían necesarios nuevos estudios sobre la aplicación de este índice en el caso de obesidad mórbida y la predicción de la respuesta a la dieta o al tratamiento de cirugía mórbida.

10. CONCLUSIÓN

Proponemos modificar el "qué, cómo y cuándo comemos" como una herramienta eficaz para disminuir nuestro riesgo genético, y como consecuencia disminuir la cronodisrupción y la obesidad. Es por tanto esta un área muy novedosa y prometedora en la prevención y tratamiento de la obesidad.

11. REFERENCIAS

- JJ dOD. Observation botanique. Historire de L'Academie Royale des Sciences. 1972: 35-6.
- Pittendrigh CS. Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1967; 58(4):1762-7.
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. Science (New York, NY) 2000; 288(5468):1013-9.
- Erren TC, Reiter RJ. Defining chronodisruption. J Pineal Res 2009; 46(3): 245-7.
- Garaulet M, Ordovas JM, Madrid JA. The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity. Int J Obes (Lond). 2010; 34(12): 1667-83.
- Haines PS, Guilkey DK, Popkin BM. Trends in breakfast consumption of US adults between 1965 and 1991. J Am Diet Assoc. 1996; 96(5): 64-70.
- Garaulet M, Gomez-Abellan P, Albuquerque-Bejar JJ, Lee YC, Ordovas JM, Scheer FA. Timing of food intake predicts weight loss effectiveness. Int J Obes (Lond). 2013; 37(4): 604-11.
- Garaulet M, Ordovas JM, Gomez-Abellan P, Martinez JA, Madrid JA. An approximation to the temporal order in endogenous circadian rhythms of genes implicated in human adipose tissue metabolism. J Cell Physiol 2011; 226(8): 2075-80.
- Jakubowicz D, Barnea M, Wainstein J, Froy O. High caloric intake at breakfast vs. dinner differentially influences weight loss of overweight and obese women. Obesity (Silver Spring) 2013; 21(12): 2504-12.
- Bandin C, Scheer FA, Luque AJ, Avila-Gandia V, Zamora S, Madrid JA, et al. Meal timing affects

- glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: A randomized, crossover trial. *Int J Obes (Lond)*. 2015; 39(5): 828-33.
11. Rubio-Sastre P, Gomez-Abellan P, Martinez-Nicolas A, Ordovas JM, Madrid JA, Garaulet M. Evening physical activity alters wrist temperature circadian rhythmicity. *Chronobiol Int* 2014; 31(2): 276-82.
 12. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science (New York, NY)*. 2005; 308(5724): 1043-5.
 13. Kennaway DJ, Owens JA, Voultzios A, Boden MJ, Varcoe TJ. Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293(4): R1528-37.
 14. Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev* 2006; 20(14): 1868-73.
 15. Sookoian S, Gemma C, Gianotti TF, Burgueno A, Castano G, Pirola CJ. Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *Am J Clin Nutr* 2008; 87(6): 1606-15.
 16. Scott EM, Carter AM, Grant PJ. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes (Lond)*. 2008; 32(4): 658-62.
 17. Garaulet M, Lee YC, Shen J, Parnell LD, Arnett DK, Tsai MY, et al. CLOCK genetic variation and metabolic syndrome risk: modulation by monounsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2009; 90(6): 1466-75.
 18. Garaulet M, Corbalan MD, Madrid JA, Morales E, Baraza JC, Lee YC, et al. CLOCK gene is implicated in weight reduction in obese patients participating in a dietary programme based on the Mediterranean diet. *Int J Obes (Lond)*. 2010; 34(3): 516-23.
 19. Garaulet M, Sanchez-Moreno C, Smith CE, Lee YC, Nicolas F, Ordovas JM. Ghrelin, sleep reduction and evening preference: relationships to CLOCK 3111 T/C SNP and weight loss. *PLoS One*. 2011; 6(2): e17435.
 20. Garaulet M, Lee YC, Shen J, Parnell LD, Arnett DK, Tsai MY, 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* 2010; 18(3): 364-9.
 21. Garaulet M, Smith CE, Gomez-Abellan P, Ordovas-Montanes M, Lee YC, Parnell LD, et al. REV-ERB-ALPHA circadian gene variant associates with obesity in two independent populations: Mediterranean and North American. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58(4): 821-9.
 22. Woltdt E, Sebti Y, Solt LA, Duhem C, Lancel S, Eeckhoutte J, et al. Rev-erb-alpha modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med* 2013; 19(8): 1039-46.
 23. Partonen T, Treutlein J, Alpmann A, Frank J, Johansson C, Depner M, et al. Three circadian clock genes Per2, Arntl, and Npas2 contribute to winter depression. *Ann Med* 2007; 39(3): 229-38. Erratum in: *Ann Med*. 2010; 42(7): 555.
 24. Garaulet M, Corbalan-Tutau MD, Madrid JA, Baraza JC, Parnell LD, Lee YC, et al. PERIOD2 variants are associated with abdominal obesity, psycho-behavioral factors, and attrition in the dietary treatment of obesity. *J Am Diet Assoc* 2010; 110(6): 917-21.
 25. Bandin C, Martinez-Nicolas A, Ordovas JM, Ros Lucas JA, Castell P, Silvente T, et al. Differences in circadian rhythmicity in CLOCK 3111T/C genetic variants in moderate obese women as assessed by thermometry, actimetry and body position. *Int J Obes (Lond)*. 2013; 37(8): 1044-50.
 26. Bandin C, Martinez-Nicolas A, Ordovas JM, Madrid JA, Garaulet M. Circadian rhythmicity as a predictor of weight-loss effectiveness. *Int J Obes (Lond)*. 2014; 38(8):1083-8.
 27. Dashti HS, Smith CE, Lee YC, Parnell LD, Lai CQ, Arnett DK, et al. CRY1 circadian gene variant interacts with carbohydrate intake for insulin resistance in two independent populations: Mediterranean and North American. *Chronobiology international*. 2014; 31(5): 660-7.
 28. Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, et al. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med* 2010; 16(10): 1152-6.
 29. Garaulet M, Gomez-Abellan P, Rubio-Sastre P, Madrid JA, Saxena R, Scheer FA. Common type 2 diabetes risk variant in MTNR1B worsens the deleterious effect of melatonin on glucose tolerance in humans. *Metabolism* 2015; 64(12): 1650-7.
 30. Crosio C, Cermakian N, Allis CD, Sassone-Corsi P. Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nature Neurosci* 2000; 3(12): 1241-7.
 31. Milagro FI, Gomez-Abellan P, Campion J, Martinez JA, Ordovas JM, Garaulet M. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. *Chronobiol Int* 2012; 29(9): 1180-94.
 32. Samblas M, Milagro FI, Gomez-Abellan P, Martinez JA, Garaulet M. Methylation on the circadian gene BMAL1 is associated with the effects of a weight loss intervention on serum lipid levels. *J Biol Rhythms* 2016; 31(3): 308-17.
 33. Corbalan-Tutau MD, Gomez-Abellan P, Madrid JA, Canteras M, Ordovas JM, Garaulet M. Toward a chronobiological characterization of obesity and

- metabolic syndrome in clinical practice. *Clin Nutr* 2015; 34(3): 477-83.
34. Garcia-Prieto MD, Tebar FJ, Nicolas F, Larque E, Zamora S, Garaulet M. Cortisol secretary pattern and glucocorticoid feedback sensitivity in women from a Mediterranean area: relationship with anthropometric characteristics, dietary intake and plasma fatty acid profile. *Clin Endocrinol* 2007; 66(2): 185-91.
 35. Corbalan-Tutau D, Madrid JA, Nicolas F, Garaulet M. Daily profile in two circadian markers "melatonin and cortisol" and associations with metabolic syndrome components. *Physiol Behav* 2014;123: 231-5.