






Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Tesi doctoral**

**Mecanismes moleculars que participen en la regulació de la Sex Hormone-Binding Globulin: factors nutricionals i fibrosi hepàtica**

**Laura Briansó Llort**

**Directors:**

Dr. David Martínez Selva   Dra. Cristina Hernández Pascual   Dr. Rafael Simó Canonge

**Tutora:**

Dra. Anna Meseguer Navarro

**Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Vall d'Hebron Institut de Recerca**

**2022**



## **AGRAÏMENTS**

Primer de tot, vull agrair als meus directors l'oportunitat que em van donar de poder formar part del seu grup de recerca i poder realitzar aquesta tesi. Al Dr. David Martínez, a la Dra. Cristina Hernández i al Dr. Rafael Simó, moltes gràcies.

Especialment agrair al David la dedicació durant aquests quatre anys i mig, perquè ha estat un mentor excel·lent, per ensenyar-me les tècniques de memòria, per la paciència, per la visió àmplia, per veure-hi més enllà i de treure'n sempre en positiu i perquè és una de les persones més resolutives que conec. Moltes gràcies per tot!

Agrair la feina de la tutora, la Dra. Ana Meseguer, i de la comissió de seguiment, al Dr. Josep Villena, al Dr. Eduard Sarró i al Dr. Miquel Vila per supervisar la feina feta i pels bons consells que em van donar all llarg d'aquests quatre anys i que han fet millorar aquesta tesi.

A les companyes de laboratori que més a prop he tingut, a la Lorena, a la Marta, a la Mireia, a la Lidia, a la Maria i a la Tania. Gràcies Lorena per fer del laboratori un lloc on voler anar a treballar cada dia i també per l'ajuda inestimable de gestió que fas, ets d'aquelles persones que quan les coneixes vols seguir mantenint el contacte amb elles per sempre. Espero seguir fent cafès amb tu o alguna altra beguda... Agrair a la Marta per ser-hi sempre que necessites alguna cosa i per les bones converses que hem tingut durant els esmorzars i es post-dinars. Gràcies Mireia per donar estabilitat i tranquil·litat quan es necessita i també per dir les coses clares, per la predisposició a ajudar sempre que tens i els bons consells que dones, tant dels purament tècnics com de tot el que rodeja la recerca, espero seguint-nos trobant! Desitjar-te molta sort per l'última etapa que et queda i espero que puguis seguir fent el que t'apassiona. A la Lidia per l'ajuda incalculable que vas fer per aquesta tesi i per tota la recerca feta al laboratori 114, moltes gràcies! Gracias Maria, hemos coincidido poco tiempo y me hubiera gustado haber podido compartir más. ¡Mucha suerte con todo! També vull agrair a la Tania que ja fa temps que va marxar, però que sempre estava allà per donar bons consells. I finalment a l'Anna, que només l'he vist un parell de cops, però que m'hagués agradat poder aprendre de la seva experiència. Espero que et sentis tant a gust com jo m'he sentit durant aquests quatre anys al lab 114. A totes vosaltres, gràcies per les estones i converses durant l'esmorzar i els dinars (que feien que la setmana semblés més curta. Agrair també a l'Hugo i la Maria per l'ajuda i el suport que, des de la llunyania, m'han donat. A l'Hugo donar-li molts ànims en aquesta etapa final i a la Maria felicitar-la per la seva tesi ja llegida!

No m'oblido de les persones que van passar menys temps al laboratori, a la Claudia que va estar un anyet per aquí i que aportava alegria al laboratori. Al Borja, per les converses que hem tingut per la seva predisposició a aprendre, espero que aconseguïssis tot el que et proposis. A l'Andrea, que va ser-hi poc temps pel laboratori, però que va ajudar amb tot el que el que va poder. Agrair a la Dra. Carmen Pfeiffer i a la Mihalina, que van fer que practiquéssis l'anglès amb elles i hem van aportar coneixements que no hagués pogut adquirir si no haguessin vingut d'estada al laboratori. Moltes gràcies a totes.

També vull agrair el suport que em va donar l'Anna, que va reaparèixer per sorpresa després de sis anys sense veure'ns. Moltes gràcies per les xerradetes i l'ajuda que no vas

dubtar a prestar sobre estadística quan te la vaig demanar. A tots els companys de cultius i de passadís, lab 116-117 i antic lab 118 per l'ajuda que sempre m'han donat en qualsevol dubte que hagi tingut. A les noies del lab 120, perquè vaig fer allà les pràctiques del màster i hi vaig aprendre a fer la famosa tècnica del Western Blot (no sabia dir quants ens vaig arribar a fer durant aquells mesos... i durant el doctorat...). Gràcies Anna i Silvia pels mesos que vaig passar per allà i pels anys de després, quan vaig començar la tesi al lab 114, pels consells i l'alegria que aportàveu. I agrair a la Penélope les tardes que ens escoltàvem mútuament quan alguna cosa no anava massa bé i per animar-me. Moltes felicitats per la tesi! I finalment, del VHIR agrair a totes les persones de coordinació de laboratoris, servei de neteja i zeladors, per fer la vida una mica més fàcil.

De la part de recerca no em vull oblidar de dues persones que em van ensenyar, just sortida de la carrera, el que era fer recerca i que mai van dubtar a escriure'm una carta de recomanació quan els hi vaig demanar. A la Dra. Carolina Serena, del IISPV de Tarragona, per la paciència que vas tenir a ensenyar-me quan encara no sabia res. I a la Dra. Maria Jose Perez, per acollir-me durant el màster i motivar-me a fer el doctorat, moltes gràcies a les dues.

Per la part personal primer voldria donar les gràcies a les amigues de sempre: Mireia, Laia, Eva, Raquel, Alba, Josepa, Lídia i Tania, perquè sou un pilar a la meva vida i perquè sempre hi sou quan us necessito, moltes gràcies per ser-hi sempre i pels sopars, celebracions i alguna que altra videotrucada Alemanya-Valls que hem fet durant aquests anys i que m'han anat tant bé.

A les amigues que vaig conèixer a la universitat i amb les que seguim en contacte: a la Mar, a l'Ester i a la Cris. Potser no us veig tot el que voldria, i aquests anys quan he viscut a Barcelona i la COVID han fet impossible poder-nos veure més, però sou una constant des de fa més de deu anys a la meva vida i sou un suport molt important.

Als palmeros de la CJXV, per recarregar les piles els divendres a assaig, pels mil i un plans dels caps de setmana, pels vermuts dels dissabtes i diumenges al sol, dies de platja, piscina, rutes, sopars, dinars, festes... perquè les estones amb vosaltres fan oblidar qualsevol maldecap, moltes gràcies per tot a tots!

A la meva família, a la meva mare i al meu pare, Montserrat i Ramon Miquel, perquè han fet que jo ara pugui estar escrivint aquestes línies, pel suport incondicional, encoratjant-me en tot i en no posar-me frens en res del que volgués fer, moltes gràcies per tot. A les meves germanes, Sònia i Mireia, un recolzament imprescindible en tot aquest procés i durant tota la meva vida, aquest tesi no hauria estat possible sense el vostre suport. Sobretot a la Mireia, ningú em sap calmar els ànims com ho fas tu i això ha estat molt important durant aquests quatre anys, moltes gràcies per tot. També a tots els meus tiets, tietes, cosins i cosina i sense oblidar els meus avis, els que veuran aquesta tesi acabada i els que no em van veure ni començar-la, perquè sempre els he tingut al costat i en ment i vaig poder aprendre d'ells el que és realment important a la vida. En definitiva, moltes gràcies a tots, perquè no som una família massa gran, però som una gran família!

I finalment, a la Lidia, moltes gràcies per tot el que fas per mi, sense tu aquest camí se m'hagués fet molt més dur. Espero seguir compartint molts més camins amb tu.





# RESUM





## RESUM

La globulina transportadora d'hormones sexuals (SHBG) és una glicoproteïna homodimèrica sèrica produïda pel fetge que uneix amb gran afinitat i especificitat als esteroides sexuals i en regula la seva biodisponibilitat. La SHBG hepàtica es troba regulada per diferents factors nutricionals com els carbohidrats, l'oli d'oliva o el resveratrol (RSV). Diversos estudis epidemiològics mostren una correlació positiva entre el consum de cafeïna i els nivells plasmàtics de la SHBG. En aquesta tesi s'ha determinat si la cafeïna és un nou factor nutricional que regula l'expressió hepàtica de la SHBG realitzant estudis amb el ratolí transgènic per la *SHBG* humana i amb les línies cel·lulars HepG2 i 3T3-L1. Els resultats d'aquest estudi mostren que la cafeïna augmenta els nivells de la SHBG plasmàtica de manera indirecta, augmentant els nivells d'adiponectina al teixit adipós mitjançant la via de l'AKT/FoxO1. L'augment de l'adiponectina plasmàtica incrementa els nivells d'HNF-4 $\alpha$  al fetge que, conseqüentment, activa l'expressió hepàtica de la SHBG. Aquests resultats expliquen la correlació positiva observada entre el consum de cafeïna i els nivells plasmàtics de la SHBG.

En diversos estudis s'ha observat que la dieta Mediterrània redueix el risc de patir malalties cardiovasculars (CVD) i que el vi negre, component important d'aquesta dieta, també presenta beneficis similars. A més, un estudi previ va determinar que el tractament amb RSV, un polifenol present al vi negre, augmentava l'expressió hepàtica de la SHBG activant al receptor constitutiu de l'androstà humà. En aquesta tesi es presenten els resultats d'un estudi pilot amb vint-i-sis voluntaris sans on es va estudiar si el contingut en RSV dels vins negres modifica els nivells plasmàtics de la SHBG en humans. Els resultats mostren que el consum moderat de vi negre ric en RSV disminueix significativament els nivells de colesterol total en sang en homes i en dones i només augmenta els nivells plasmàtics de la SHBG en dones. En canvi, el consum moderat de vi negre amb un baix contingut en RSV no modifica cap dels paràmetres analitzats. Aquest estudi obre les portes a realitzar un estudi clínic amb més participants per tal de determinar si el contingut en RSV dels vins negres i l'efecte que provoca sobre els nivells plasmàtics de la

SHBG juguen un paper significatiu en les accions beneficioses del consum moderat de vi negre en el desenvolupament de les malalties CVD.

Els nivells plasmàtics de la SHBG es troben disminuïts en moltes malalties metabòliques humanes com en la malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD) o l'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH). A més, nivells plasmàtics disminuïts de la SHBG prediuen el desenvolupament de CVD i de la diabetis de tipus 2. La NAFLD és un espectre de malalties que progressen de l'esteatosi simple a la NASH, on hi ha presència d'inflamació i fibrosi, la qual pot desenvolupar cap a estadis més greus com la cirrosi o l'hepatocarcinoma. En aquesta tesi s'han estudiat els mecanismes moleculars que regulen l'expressió hepàtica de la SHBG durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica utilitzant el model animal d'inducció de fibrosi hepàtica per injeccions intraperitoneals de  $\text{CCl}_4$  amb el ratolí transgènic per la *SHBG* humana i la línia cel·lular HepG2. Aquest estudi ha determinat que el TGF- $\beta$ 1, factor que es troba augmentat durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica, disminueix la producció de la SHBG hepàtica mitjançant una reducció dels nivells de les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$  i un augment de les isoformes P2-HNF-4 $\alpha$  activant les vies dels SMADs i el STAT3 a través dels receptors del TGF- $\beta$ 1. Aquests resultats assenyalen al TGF- $\beta$ 1 com un factor que podria estar implicat en els baixos nivells de la SHBG plasmàtica observats en pacients amb NASH i fibrosi hepàtica.

## RESUMEN

La globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) es una glicoproteína homodimérica sérica producida por el hígado que une con gran afinidad y especificidad a esteroides sexuales regulando su biodisponibilidad. La SHBG está regulada por diferentes factores nutricionales como los carbohidratos, el aceite de oliva o el resveratrol (RSV). Varios estudios epidemiológicos muestran una correlación positiva entre el consumo de productos con cafeína y los niveles plasmáticos de SHBG. En esta tesis se ha estudiado si la cafeína es un nuevo factor que regula la expresión hepática de la SHBG realizando estudios con el ratón transgénico para la *SHBG* humana y con las líneas celulares HepG2 y 3T3-L1. La cafeína aumenta los niveles de la SHBG plasmática de forma indirecta, aumentando los niveles de la adiponectina en el tejido adiposo a través de la vía del AKT/FoxO1. El aumento de la adiponectina plasmática incrementa los niveles de HNF-4 $\alpha$  en el hígado que activan la expresión hepática de la SHBG. Estos resultados explican la correlación positiva observada entre el consumo de cafeína y los niveles plasmáticos de la SHBG.

En varios estudios se ha visto que la dieta Mediterránea reduce el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (CVD) y el vino tinto, componente importante en esta dieta, presenta beneficios similares. Además, un estudio previo determinó que el tratamiento con RSV, polifenol presente en el vino tinto, aumenta la expresión de la SHBG hepática activando al receptor constitutivo del androstano humano. En esta tesis se presentan los resultados de un estudio piloto con veintiséis participantes sanos donde se estudia si el contenido en RSV de los vinos tintos modifica los niveles plasmáticos de la SHBG en humanos. Los resultados muestran que el consumo moderado de vino tinto con alto contenido en RSV disminuye el colesterol total en sangre en hombres y en mujeres y solo aumenta los niveles de la SHBG plasmática en mujeres. En cambio, el consumo de vino tinto con un bajo contenido en RSV no modifica ninguno de los parámetros analizados. Este estudio abre las puertas a la realización de un estudio clínico más amplio que sea capaz de determinar si el contenido en RSV de los vinos tintos y el efecto que provoca sobre los niveles plasmáticos de la SHBG juegan un papel

significativo en las acciones beneficiosas en el desarrollo de las enfermedades CVD que presenta el consumo moderado de vino tinto.

Los niveles plasmáticos de la SHBG se encuentran disminuidos en muchas enfermedades metabólicas como en la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) o la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Además, niveles plasmáticos disminuidos de la SHBG predicen el desarrollo de enfermedades CVD y de la diabetes de tipo 2. La NAFLD es un espectro de enfermedades que progresan desde la esteatosis simple a la NASH, donde existe presencia de inflamación y fibrosis, y puede llegar a estadios más graves como la cirrosis o el hepatocarcinoma. En esta tesis se han estudiado los mecanismos moleculares que regulan la expresión hepática de la SHBG durante el desarrollo de la fibrosis hepática utilizando el modelo animal de inducción de fibrosis hepática con inyecciones intraperitoneales de  $\text{CCl}_4$  con el ratón transgénico para la *SHBG* humana y la línea celular HepG2. En este estudio se ha determinado que el TGF- $\beta$ 1, factor que se encuentra aumentado durante el desarrollo de la fibrosis hepática, disminuye la producción hepática de la SHBG reduciendo los niveles de las isoformas P1-HNF-4 $\alpha$  y aumentando los niveles de las isoformas P2-HNF-4 $\alpha$  mediante las vías de los SMADs y el STAT3 a través de los receptores de TGF- $\beta$ 1. Estos resultados apuntan al TGF- $\beta$ 1 como un factor que podría estar implicado con los bajos niveles de la SHBG plasmática observados en pacientes con NASH y fibrosis hepática.

## ABSTRACT

Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) is a glycoprotein secreted by the liver into the blood where it binds and transports sex steroids with high affinity and specificity and regulates its bioavailability. SHBG is regulated by different nutritional factors, such as carbohydrates, olive oil or resveratrol (RSV). Some epidemiologic studies show a positive correlation between the caffeine intake and high SHBG plasma levels. This thesis determines the molecular mechanism by which caffeine upregulates hepatic SHBG production using the *SHBG* transgenic mice and the HepG2 and 3T3-L1 cell lines. Caffeine upregulates SHBG expression indirectly by increasing adiponectin production through AKT/FoxO1 pathway in adipose tissue. The increase of adiponectin elevates the levels of hepatic HNF-4 $\alpha$  which in turn upregulates hepatic SHBG expression. These results explain the positive correlation between caffeine intake and high SHBG plasma levels.

Some studies show that Mediterranean diet reduces the risk of developing cardiovascular diseases (CVD) and similar beneficial effects have been attributed to red wine, an important component of this diet. Furthermore, a previous study shown that RSV, a red wine polyphenol, increased hepatic SHBG expression through activation of human constitutive androstane receptor. This thesis presents the results obtained in a pilot study with twenty-six healthy volunteers in which it is studied whether the RSV content of red wine modifies the SHBG plasma levels in humans. The results show that moderate intake of red wine with high RSV content decreases the total cholesterol in serum in both, men and women, and it only increases circulating SHBG in women. By contrast, moderate intake of red wine with low RSV content does not modify any of the studied parameters. This pilot study paves the way to future larger clinical studies aimed at determining whether RSV content and its effect in SHBG levels play a significant role in the beneficial cardiovascular actions of red wine.

SHBG plasma levels are reduced in some metabolic diseases, such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Moreover, reduced SHBG plasma levels could predict the development of CVD

and type 2 diabetes. NAFLD is a spectrum of diseases that progress from simple steatosis to steatosis with inflammation and fibrosis, referred to as NASH, which can progress to more severe stages such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma. This thesis studies the molecular mechanisms that regulate hepatic SHBG expression during liver fibrosis development using the human *SHBG* transgenic mice developing liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> and the HepG2 cell line. This study demonstrates that TGF- $\beta$ 1, a factor which is increased in liver fibrosis development, reduces hepatic SHBG production by downregulating P1-HNF-4 $\alpha$  isoforms and upregulating P2-HNF-4 $\alpha$  isoforms via SMADs and STAT3 pathways through TGF- $\beta$ 1 receptors. These results point out TGF- $\beta$ 1 as the factor that reduces SHBG levels in NASH and liver fibrosis.

# ÍNDEX





## ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ.....	16
1.1. La globulina transportadora d'hormones sexuals.....	16
1.1.1. <i>Funció de la SHBG plasmàtica</i> .....	17
1.1.2. <i>Gen de la SHBG humana</i> .....	20
1.1.3. <i>Expressió de la SHBG</i> .....	21
1.1.3.1. Expressió de la SHBG en humans .....	21
1.1.3.1.1. Expressió de la SHBG hepàtica .....	22
1.1.3.1.2. Regulació transcripcional del P <sub>L</sub> .....	23
1.1.3.1.3. Expressió de la SHBG testicular .....	25
1.1.3.2. Expressió de la <i>Shbg</i> en ratolins .....	26
1.1.3.3. El ratolí transgènic per la SHBG humana .....	27
1.1.4. <i>Factors de transcripció que regulen l'expressió de la SHBG</i> <i>hepàtica</i> .....	30
1.1.4.1. HNF-4 $\alpha$ .....	31
1.1.4.2. PPAR $\gamma$ .....	33
1.1.4.3. COUP-TFI.....	35
1.1.4.4. USF .....	35
1.1.4.5. ER $\alpha$ .....	36
1.1.4.6. CAR .....	36
1.1.5. <i>Estructura proteica de la SHBG</i> .....	38
1.1.5.1. Lloc d'unió a esteroide.....	39
1.1.5.2. Domini de dimerització .....	40
1.1.5.3. Glicosilacions .....	41
1.1.6. <i>Nivells plasmàtics de la SHBG</i> .....	41
1.1.6.1. Durant el desenvolupament fetal.....	42
1.1.6.2. Infantesa i pubertat.....	43
1.1.6.3. Edat adulta .....	43
1.1.6.4. Alteracions dels nivells plasmàtics de la SHBG en les malalties humanes.....	44
1.1.6.4.1. Desordres tiroïdals.....	44

1.1.6.4.2.	Obesitat .....	44
1.1.6.4.3.	Síndrome metabòlic i diabetis tipus 2 .....	45
1.1.6.4.4.	Malalties cardiovasculars .....	45
1.1.6.4.5.	Esteatosis hepàtica no alcohòlica .....	46
1.1.6.4.6.	Síndrome de l'ovari poliquístic.....	47
1.1.7.	<i>Regulació de la SHBG</i> .....	47
1.1.7.1.	Factors genètics .....	47
1.1.7.2.	Factors hormonals .....	49
1.1.7.2.1.	Esteroides sexuals .....	49
1.1.7.2.2.	Hormones tiroïdals.....	49
1.1.7.2.3.	Insulina .....	50
1.1.7.3.	Citocines .....	50
1.1.7.3.1.	TNF $\alpha$ .....	51
1.1.7.3.2.	IL-1 $\beta$ .....	51
1.1.7.3.3.	Adiponectina .....	52
1.1.7.4.	Factors nutricionals .....	52
1.1.7.4.1.	Carbohidrats i palmitat .....	53
1.1.7.4.2.	Oli d'oliva.....	53
1.1.7.4.3.	Compostos polifenòlics del vi negre: el resveratrol.....	54
1.1.7.4.4.	Productes amb cafeïna .....	55
1.1.7.5.	Regulació de la SHBG en el desenvolupament de malalties humanes: obesitat i NAFLD .....	57
1.1.8.	<i>Implicacions terapèutiques de la SHBG en les malalties humanes: obesitat i NAFLD</i> .....	58
1.2.	Malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD) .....	63
1.2.1.	<i>Diagnòstic de la NAFLD</i> .....	65
1.2.2.	<i>Progressió de la NAFLD</i> .....	66
1.2.2.1.	Esteatosis hepàtica .....	66
1.2.2.2.	NASH .....	67
1.2.2.2.1.	Factors implicats en la progressió de la NAFLD / NASH....	68
1.2.2.2.1.1	Estrès oxidatiu i lipotoxicitat .....	69
1.2.2.2.1.2	Estrès del reticle endoplasmàtic .....	69

1.2.2.2.1.3	Microbiota intestinal .....	69
1.2.2.2.1.4	Citocines proinflamàtòries .....	70
1.2.2.2.2.	Inflamació hepàtica.....	70
1.2.2.3.	Fibrosi hepàtica i cirrosi .....	72
1.2.3.	TGF- $\beta$ en la NAFLD.....	75
1.2.3.1.	Vies de senyalització del TGF- $\beta$ .....	75
1.3.	Models animals per l'estudi de la fibrosi hepàtica .....	78
1.3.1.	Tetraclorur de carboni (CCl <sub>4</sub> ).....	78
<b>2.</b>	<b>HIPÒTESIS I OBJECTIUS .....</b>	<b>84</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>88</b>
3.1.	Estudi de la regulació de la SHBG per factors nutricionals i cerca dels mecanismes moleculars involucrats: la cafeïna .....	88
3.2.	Estudi pilot de l'efecte del contingut de resveratrol dels vins negres en els nivells plasmàtics de la SHBG.....	90
3.3.	Anàlisi de la regulació hepàtica de la SHBG en la fibrosi hepàtica i estudi dels mecanismes moleculars implicats.....	92
<b>4.</b>	<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>98</b>
4.1.	Estudi de la regulació de la SHBG per factors nutricionals i cerca dels mecanismes moleculars involucrats: la cafeïna .....	98
4.2.	Estudi pilot de l'efecte del contingut de resveratrol dels vins negres en els nivells plasmàtics de la SHBG.....	103
4.3.	Anàlisi de la regulació de la SHBG durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica i estudi dels mecanismes moleculars implicats .....	107
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>118</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÈNCIES.....</b>	<b>122</b>

## ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1: Alineament de les seqüències d'aminoàcids de la SHBG humana i de l'ABP de rata. ....	17
Figura 2: Models de la captació dels esteroides sexuals per part de les seves cèl·lules diana. ....	20
Figura 3: Estructura del gen de la <i>SHBG</i> humana. ....	21
Figura 4: Esquema del transcrit de la SHBG que s'expressa al fetge. ....	22
Figura 5: Regulació transcripcional del promotor proximal o P <sub>L</sub> . ....	24
Figura 6: Comparació filogenètica de les seqüències del promotor de la <i>SHBG</i> . ....	27
Figura 7: Localització cel·lular de la SHBG humana als ratolins transgènics per la <i>SHBG</i> humana. ....	29
Figura 8: Expressió de les 12 isoformes conegudes d'HNF-4 $\alpha$ regulades pel promotor proximal P1 o el promotor distal P2. ....	32
Figura 9: Estructura proteica de la SHBG i els seus dominis. ....	38
Figura 10: Mecanismes moleculars que regulen l'expressió hepàtica de la SHBG. ....	56
Figura 11: Mecanismes moleculars que regulen l'expressió de la SHBG durant el desenvolupament de l'obesitat i la NAFLD. ....	58
Figura 12: Implicacions terapèutiques de la SHBG en l'esteatosi hepàtica i l'obesitat. ....	60
Figura 13: Implicacions terapèutiques de la SHBG en la inflamació. ....	61
Figura 14: Desenvolupament de la NAFLD. ....	64
Figura 15: Factors implicats en la progressió de la NAFLD / NASH. ....	68
Figura 16: Factors que activen els macròfags durant el desenvolupament de la NAFLD i la NASH. ....	71
Figura 17: Diferents factors que activen les HSC. ....	74

Figura 18: Vies de senyalització del TGF- $\beta$ 1.....	76
Figura 19: Efectes del TGF- $\beta$ 1 a les HSC.....	78
Figura 20: Mecanismes moleculars pels quals la cafeïna incrementa els nivells plasmàtics de la SHBG.....	102
Figura 21: El consum de vi negre ric en resveratrol augmenta els nivells plasmàtics de SHBG en dones i disminueix els nivells de colesterol total en homes i dones.....	107
Figura 22: Mecanisme molecular pel qual el TGF- $\beta$ 1 redueix els nivells d'expressió hepàtica de la SHBG.....	113

## **ÍNDEX DE TAULES**

Taula 1: Rangs de referència de les concentracions plasmàtiques de la SHBG (nM) en diferents edats en humans.....	42
Taula 2: Sistema NASH-CRN.....	66



# ABREVIATURES





## ABREVIATURES

ABP	<i>Androgen-binding protein</i>	Proteïna lligadora d'andrògens
ACC1	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>	Acetil CoA carboxilasa
ADNc	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>	Àcid desoxiribonucleic complementari
ALT	<i>Alanine transaminase</i>	Alanina-aminotransferasa
ARNm	<i>Messenger ribonucleic acid</i>	Àcid ribonucleic missatger
AST	<i>Aspartate transaminase</i>	Aspartat-aminotransferasa
BMI / IMC	<i>Body mass index</i>	Índex de massa corporal
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>	Receptor constitutiu d'androstà
CCl <sub>4</sub>	<i>Carbon tetrachloride</i>	Tetraclorur de carboni
COUP-TF	<i>Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor</i>	Factor de transcripció <i>upstream</i> d'ovoalbúmina de pollastre
CVD	<i>Cardiovascular diseases</i>	Malalties cardiovasculars
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>	Patró molecular associat a dany
DHT	<i>Dihydrotestosterone</i>	Dihidrotestosterona
DMT2	<i>Type 2 diabetes mellitus</i>	Diabetis mellitus tipus 2
DNL	<i>De novo lipogenesis</i>	Lipogènesis <i>de novo</i>
DR1	<i>Direct repeat 1</i>	Repetició directa 1
DR2	<i>Direct repeat 2</i>	Repetició directa 2
ER $\alpha$	<i>Estrogen receptor alpha</i>	Receptor d'estrògens alfa
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>	Àcid gras sintasa

FP	<i>Footprinting regions</i>	Regions <i>footprinting</i>
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>	Receptor X farnesoide
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i>	Carcinoma hepatocel·lular o hepatocarcinoma
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>	Lipoproteïna d'alta densitat
HNF-4 $\alpha$	<i>Hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i>	Factor nuclear 4 alfa d'hepatòcit
HPG	<i>Hypothalamic-pituitary-gonadal axis</i>	Eix hipotalàmic-hipofisiari-gonadal
HSC	<i>Hepatic Stellate Cells</i>	Cèl·lules estrellades
IL-1 $\beta$	<i>Interleukin 1 beta</i>	Interleuquina 1 beta
IL-6	<i>Interleukin 6</i>	Interleuquina 6
JNK	<i>c-Jun N-terminal</i>	Cinasa c-Jun N-terminal
kb	<i>Kilobase</i>	Kilobase
kDa	<i>Kilodalton</i>	Kilodalton
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>	Lipoproteïna de baixa densitat
LG domain	<i>Laminin G-like domain</i>	Domini semblant a la laminina
LXR	<i>Liver X receptor</i>	Receptor X hepàtic
MAPK/ERK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>	Via de les proteïnes cinases activades per mitògens
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>	Proteïna quimioatracent de monòcits 1
MEC	<i>Extracellular matrix</i>	Matriu extracel·lular
MFB	<i>Myofibroblast</i>	Miofibroblast
MMP	<i>Metalloproteases</i>	Metal·loproteïnases

MUFA	<i>Monounsaturated fatty acids</i>	Àcids grassos monoinsaturats
NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>	Malaltia del fetge gras no alcohòlic
NASH	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>	Esteatohepatitis no alcohòlica
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	Factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades
PCOS	<i>Polycystic ovary syndrome</i>	Síndrome de l'ovari poliquístic
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>	Receptor activat per proliferadors de peroxisoma gamma
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>	Àcids grassos poliinsaturats
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>	Espècies reactives d'oxigen
R <sub>SHBG</sub>	<i>SHBG receptor</i>	Receptor de la SHBG
RSV	<i>Resveratrol</i>	Resveratrol
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>	Receptor X de retinoides
SBP	<i>Sex-steroid binding protein</i>	Proteïna lligadora d'esteroides sexuals
SHBG	<i>Sex hormone-binding globulin</i>	Globulina lligadora d'hormones sexuals
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>	Polimorfisme de nucleòtid únic
SSBG	<i>Sex steroid binding globulin</i>	Globulina lligadora d'esteroides sexuals
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>	Transductor i activador de la transcripció 3
TEBG	<i>Testosterone-estradiol binding globulin</i>	Globulina transportadora de testosterona-estradiol
TGF $\beta$ 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>	Factor de creixement transformant beta 1
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteases</i>	Inhibidor tissular de les metal·loproteïnases
TLR	<i>Toll-like receptor</i>	Receptor tipus Toll

TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>	Factor de necrosis tumoral alfa
USF	<i>Upstream stimulatory factor</i>	Factor estimulant corren amunt
WT	<i>Wild-type</i>	De tipus natural

# INTRODUCCIÓ



## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1. La globulina transportadora d'hormones sexuals

La globulina transportadora d'hormones sexuals (SHBG: *Sex Hormone-Binding Globulin*) és una glicoproteïna homodimèrica sèrica, d'aproximadament 90 kiloDaltons (kDa), produïda pel fetge que uneix amb gran afinitat i especificitat als esteroides sexuals i en regula la seva biodisponibilitat [1].

L'any 1958 es va conjecturar la seva existència [2] i l'any 1965 dos grups la van identificar en la fracció de les  $\beta$ -globulines del plasma humà. Mercier-Bodard *et al.* (1965) la van descriure com una proteïna lligadora d'andrògens [3], mentre que Rosenbaum *et al.* (1966) la van identificar com una proteïna lligadora d'estrògens [4]. Finalment, l'any 1968 es va observar que aquestes dues proteïnes eren la mateixa i que unia amb gran afinitat a la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), a la testosterona i a l'estradiol [5] i se la va anomenar globulina transportadora de testosterona-estradiol (TEBG: *Testosterone-Estradiol Binding Globulin*). Des d'ençà, s'ha vist que la SHBG uneix a altres esteroides sexuals [6].

Durant els següents anys, es va observar que la SHBG era produïda en hepatòcits transformats en cultius [7] i es va detectar presència del seu ARNm als hepatòcits [8–12]. Paral·lelament, durant els anys 70, es va descriure una proteïna produïda als testicles i transportada a l'epidídim de la rata que unia amb gran afinitat a esteroides sexuals i se la va anomenar proteïna transportadora d'andrògens (ABP: *Androgen-binding protein*) [13,14], finalment, es va demostrar que l'ABP era secretada per les cèl·lules de Sertoli [15]. Durant anys, es va especular que l'ABP i la SHBG estaven molt relacionades, però no va ser fins a mitjans dels anys 80, quan es van caracteritzar químicament les dues proteïnes mitjançant tècniques immunoquímiques i estudis estructurals, que es va observar que la SHBG i l'ABP eren químicament indistingibles [16–19].

A finals dels anys 80, es va determinar la seqüència primària completa de la SHBG humana [20], al mateix temps, es va clonar i seqüenciar l'ADNc de l'ABP de rata i se'n va deduir la seqüència d'aminoàcids de la proteïna [21]. Alineant les dues seqüències es va observar que les dues proteïnes compartien el 67% de la



seqüència d'aminoàcids (Figura 1). Finalment, es van clonar els gens i els ADNc de la SHBG i de l'ABP humana i de rata i l'ADNc de la SHBG hepàtica fetal de rata i es va veure que la SHBG i l'ABP estaven codificades pel mateix gen [8,12,22,23]. Per tant, l'ABP i la SHBG son la mateixa proteïna produïda en dos teixits diferents [24].

NW Score	Identities	Positives	Gaps
1386	272/404(67%)	312/404(77%)	3/404(0%)
Human SHBG 1	MESRGLPLAT--SRLLLLLLLLLRHTRQGWALRPVLPQTQSAHDPPAVHLSNGPGQEPVAV	ME +G +A+ RLLLLLLLL L T QG LR + P QSA D PA +LSNGPGQEP+ V	58
Rat ABP 1	ME -KGEVASLRCLLLLLLLLLLTPPTHQGRTRHIDPIQSAQDSPAKYLSNGPGQEPVTV		59
Human SHBG 59	MTFDLTKITKTSSEFEVVRTWDPGVIIFYGDTNPKDDWFMGLGRDGRPEIQLHNHWAQLTV	+T DLTKI+K SSSFE RTWDPEGVIIFYGDTN +DDWFMGLGRD+ EIQLHN WA-LTV	118
Rat ABP 60	LTIDLTKISKPSSEFEFRTWDPGVIIFYGDTNTEDDWFMGLGRDQLEIQLHNHWARLTV		119
Human SHBG 119	GAGPRLDDGRWHQVEVKMEGDSVLLVDGEEVLRRLRQVSGPLTSKRHPIMRIALGGLLFP	G GPRL+DGRWH VE+KM GDS+LL VDG+E+L LRQVS L MRIALGGLL P	178
Rat ABP 120	GFGPRLNDGRWHPVELKMNGDSELLVVDGKEMCLRQVSASLADHPQLSMRIALGGLLFP		179
Human SHBG 179	ASNLRLPLVPALDGLRRDSDWKQAEISASAPTSLRSCDVESNPGIFLPPGTAQAEFNLR	S LR PLVPALDGC+RRD WL QA++S SA TSL +CDV+ PG+F PPGT AEF+L+	238
Rat ABP 180	TSKLRFLPLVPALDGCIRRDIIWLGHQAQLSTASRTSLGNCDVDLQPGFLFFPGTHAEFSLQ		239
Human SHBG 239	DIPQPHAEPWAFSLDLGLKQAAGSGHLLALGTPENPSWLSLHLQDQKVVLSGSGPGLDL	DIPQPH +PW FSL+LG K G+G LL LGT N SWL+LHLQDQ VVLS+ P L L	298
Rat ABP 240	DIPQPHDPWTFSLELGFKLVDGAGRLTLGTGNTSSWLTLLHLDQQTVVLSSEAEPLKAL		299
Human SHBG 299	PLVVLGLPLQLKLSMRVLSQGSKMALALPPLGLAPLLNLWAKPQGRFLGALPGEDSS	PL +GLPLQLK + +V LSQG KM+ L+ L LA L LW+ PQG L LGALPGEDSS	358
Rat ABP 300	PLAVGLPLQLKLDVFKVALSQGPKMEVLSTSLRLASLWRLWHPQGHLSLALGALPGEDSS		359
Human SHBG 359	TSFCLNGLWAQGRDLDVQALNRSHEIWTWSCPQSPGNGTDASH	TSFCL+ LW QGQRD+D+AL+RS +IWTWSCPQSP N T SH	402
Rat ABP 360	ASFCLSDLVWQGRDLDIDKALSRSDIWTWSCPQSPSNDTHTSH		403

**Figura 1:** Alineament de les seqüències d'aminoàcids de la SHBG humana i de l'ABP de rata. Les seqüències d'aminoàcids de la SHBG humana produïda pel fetge i de l'ABP de rata tenen una identitat del 67%. Alineament realitzat amb l'eina: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

### 1.1.1. Funció de la SHBG plasmàtica

Els esteroides sexuals son molècules lipofíliques sintetitzades a les cèl·lules esteroidogèniques de les gònades, de les glàndules suprarenals i de la placenta. Els esteroides sexuals regulen diversos processos com, per exemple: el desenvolupament embrionari, la diferenciació sexual, el desenvolupament gonadal, la maduració i creixement dels teixits reproductius i el metabolisme, entre molts altres [25]. Els esteroides sexuals circulen pel torrent sanguini fins als seus teixits o cèl·lules diana, però degut a la seva naturalesa hidròfoba, només el 2%

es troba de forma lliure, ja que la majoria circulen units a proteïnes plasmàtiques que en regulen la seva biodisponibilitat [1].

Entre aquestes proteïnes plasmàtiques, es troba l'albumina que uneix amb una baixa afinitat (a l'ordre de  $\mu\text{M}$ ) i de forma inespecífica a tota classe d'esteroides sexuals, transportant-los pel torrent sanguini i allargant-ne la seva vida mitja [26]. En canvi, la SHBG uneix amb gran especificitat i afinitat (a l'ordre de nM) als esteroides sexuals, sobretot a andrògens i estrògens. La SHBG es troba en concentracions plasmàtiques molt més baixes que l'albumina, però, gràcies a la seva gran especificitat i afinitat pels esteroides sexuals, juga un paper clau en la seva biodisponibilitat a nivell de teixit [27,28] i és la proteïna transportadora d'hormones sexuals més important. Alteracions dels nivells plasmàtics de la SHBG fan variar la distribució i l'accés a nivell de teixit i cèl·lules diana dels esteroides sexuals [29].

En aquest sentit, la SHBG posseeix una major afinitat pels andrògens que pels estrògens. Concretament, la DHT és l'esteroides sexual que s'uneix amb més afinitat a la SHBG. S'hi uneix fins a cinc vegades amb més afinitat que la testosterona i fins a vint vegades amb més afinitat que l'estradiol. Dels esteroides sexuals amb més afinitat per la SHBG, seguint la DHT, es troben, per ordre d'afinitat: la testosterona, l'androstenediol, l'estradiol i l'estrone [6].

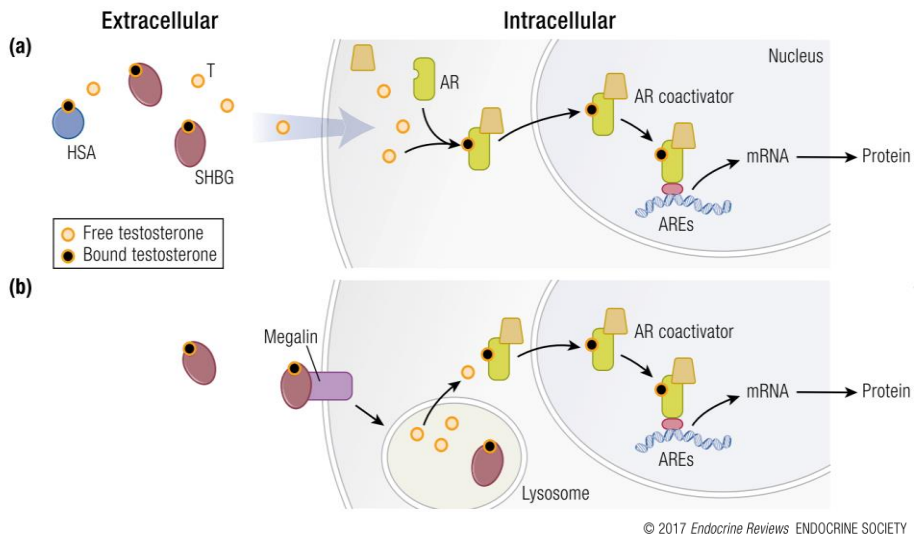
La proteïna SHBG conté dos llocs d'unió a esteroide, per tant, pot unir dues molècules d'esteroides sexual [30,31]. No tota la SHBG circulant es troba ocupada per esteroide sexual i existeixen diferències entre els dos sexes en l'ocupació dels llocs d'unió a esteroide sexual. Concretament, en homes, el 80% dels llocs d'unió a esteroide es troben ocupats majoritàriament per la testosterona, en canvi, en dones, només el 20% dels llocs d'unió a esteroide estan ocupats [6,27]. A més, en dones sotmeses a tractament amb anticonceptius orals, les quals presenten nivells plasmàtics augmentats de la SHBG, presenten una baixa ocupació d'esteroides sexual als seus llocs d'unió [27,32]. Aquest fet comporta implicacions clíniques, ja que els llocs que no es troben ocupats per esteroide sexual poden unir altres lligands, com per exemple, a esteroides sintètics, flavonoides o xenobiòtics [33].

En la clínica, la mesura per immunoassaig de la SHBG circulant s'utilitza per calcular l'estimació dels esteroides sexuals lliures en plasma [28,34], acceptant que totes les molècules de la SHBG uneixen amb la mateixa afinitat als diferents esteroides sexuals. Aquesta mesura podria no ser real en tots els casos, ja que existeixen variants de la SHBG que uneixen amb baixa afinitat a la testosterona i d'altres que no són reconegudes pel propi immunoassaig [35]. Per tant, seria necessari la utilització de mètodes directes de mesura per determinar els nivells dels esteroides sexuals lliures en plasma [27].

La mesura de la SHBG és important, ja que, segons la hipòtesi de l'hormona lliure, els esteroides sexuals lliures, és a dir, els que no es troben units a cap proteïna plasmàtica, són els biològicament actius [36]. La teoria de l'hormona lliure defensa que la fracció d'esteroides lliures que circulen pel plasma són els únics capaços de difondre passivament a través de la membrana plasmàtica de les seves cèl·lules diana, gràcies a la seva naturalesa lipofílica, i dur a terme la seva senyalització cel·lular (Figura 2) [36]. Es creu que els esteroides sexuals que es troben units a l'albumina, degut a la unió feble que els uneix, també són capaços de dissociar-se de l'albumina i difondre passivament a les seves cèl·lules diana, sent la fracció d'esteroides sexuals que es troben lliures al plasma i els que es troben units a l'albumina els biològicament actius [37].

La teoria de l'hormona lliure ha estat discutida, l'any 2005 Hammes *et al.* van proposar que els esteroides sexuals biològicament actius són els que es troben units a la SHBG. Segons aquesta teoria, els esteroides sexuals entrarien a les cèl·lules diana mitjançant la interacció de la SHBG amb la megalina [38]. La megalina és una proteïna expressada en diversos teixits que responen a esteroides sexuals i es troba integrada a les vesícules recobertes per clatrina [39]. Segons Hammes *et al.* (2005), la megalina interaccionaria amb la SHBG i es formaria una vesícula endocítica, la qual transportaria al complex SHBG-esteroide sexual unit a la megalina. Finalment, el complex SHBG-esteroide sexual es dissociaria per acidificació de la vesícula [40] i l'esteroide sexual s'alliberaria al citoplasma cel·lular per dur a terme la seva senyalització cel·lular (Figura 2) [38,41]. Durant els últims anys, ha anat agafant força la hipòtesi de la hormona lliure i es creu que la funció de la SHBG plasmàtica és la de protegir de l'excés

d'andrògens, tant exògens com endògens, unint-los i disminuint-ne la fracció biològicament activa [42].



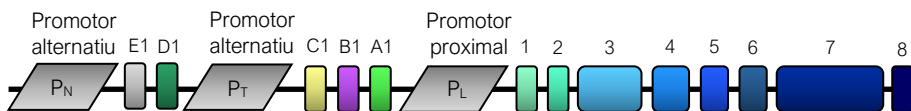
© 2017 Endocrine Reviews ENDOCRINE SOCIETY

**Figura 2:** Models de la captació dels esteroides sexuals per part de les seves cèl·lules diana. (a) Model de l'hormona lliure. Els esteroides sexuals que no es troben units a la SHBG són els biològicament actius, difonen per la membrana plasmàtica de les cèl·lules diana i s'uneixen als seus receptors. (b) Model dependent de la megalina. La SHBG unida a l'esteroides sexuals interacciona amb la megalina a la membrana plasmàtica de la cèl·lula diana i aquest complex s'internalitza pel procés endocític. A l'interior de la cèl·lula, el complex esteroides sexuals-SHBG es dissocia, a causa del baix pH de l'interior del lisosoma, i l'esteroides sexuals s'allibera al citoplasma, on s'uneix al seu receptor per dur a terme la seva senyalització cel·lular. Figura modificada de: Goldman A.L., et al. *Endocr Rev.* 2017 Aug 1;38(4):302-324.

### 1.1.2. Gen de la SHBG humana

El gen de la *SHBG* es localitza al braç curt (p12→p13) del cromosoma 17 (17p13.1) [43] i està compost per vuit exons, que ocupen aproximadament 3.2 kilobases (kb) d'ADN genòmic, i de set petits introns [12]. L'estructura del gen de la *SHBG* es troba conservat en tots els vertebrats, tot i això, la llargada dels introns pot variar entre espècies [44]. Com es pot observar a la **Figura 3**, el gen compta amb dos promotors ben caracteritzats: el promotor proximal o  $P_L$  i un promotor alternatiu o  $P_T$ , però hi ha evidència d'un segon promotor alternatiu que ha estat anomenat  $P_N$  [45]. Aquests tres promotors resulten en tres unitats de

transcripció diferents i els transcrits generats per cada unitat de transcripció estan expressats majoritàriament en fetge, testicles i pròstata, respectivament [12,45,46]. S'han detectat i descrit fins a dinou transcrits generats en diferents teixits, tot i que no es coneix la funció biològica de tots ells, s'ha especulat que podrien tenir una funció important en les diferents etapes del desenvolupament [47]. L'exó 1 dels diversos transcrits pot estar codificat pel promotor proximal (P<sub>L</sub>) o per un dels promotors alternatius (P<sub>T</sub> i P<sub>N</sub>) i hi ha evidència de l'existència de fins a cinc exons 1 alternatius situats *upstream* del promotor proximal (P<sub>L</sub>) [47,48].



**Figura 3:** Estructura del gen de la SHBG humana. L'exó 1 pot estar codificat pel promotor proximal o per un dels dos promotors alternatius, s'han descrit fins a cinc exons 1 alternatius. En canvi, els exons 2-8 són comuns pels tres promotors. Figura modificada de: Simó R, et al. *Trends Endocrinol Metab.* 2015 Jul;26(7):376-83.

### 1.1.3. Expressió de la SHBG

L'expressió de la SHBG està conservada en els vertebrats, però no tots presenten SHBG en sang en edat adulta. Per exemple, els rosegadors no presenten expressió hepàtica de la SHBG en edat adulta [23,49], en canvi, els peixos, els vertebrats més antics, expressen la SHBG al fetge [50]. A més, en humans, la SHBG s'expressa a les cèl·lules germinals dels testicles [51], en canvi, els ratolins expressen la Shbg a les cèl·lules de Sertoli [52]. L'estudi de l'expressió de la SHBG en altres vertebrats posa de manifest les diferències evolutives de l'expressió de la SHBG així com les seves diverses funcions [44].

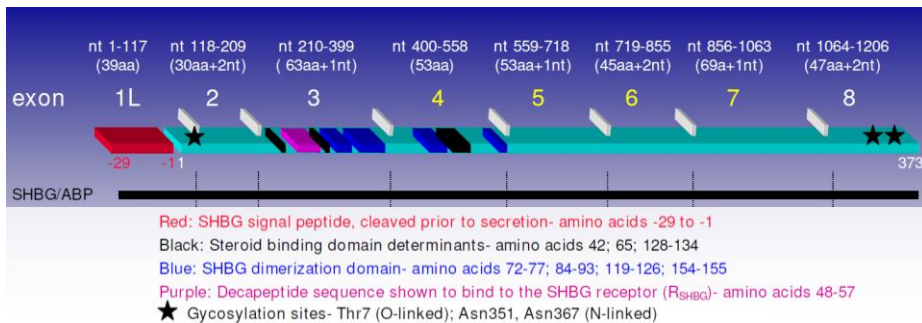
#### 1.1.3.1. Expressió de la SHBG en humans

En humans, la SHBG es troba expressada majoritàriament al fetge i a les cèl·lules germinals dels testicles [7,8,12,24,51,53]. Tot i això, també s'ha observat expressió en altres teixits, com per exemple: al ronyó [54], a la pròstata [55], al l'endometri [56], a l'ovari [57-59], a les trompes uterines [60], a la placenta [61], a les glàndules mamàries [62], en miòcits cardíacs [63] o a la melsa [64], així com

en diferents línies cel·lulars de càncer de pròstata [47,55], de càncer de mama [62], de limfòcits T [64] i en la línia cel·lular d'hepatoblastoma humà HepG2 [7]. Les cèl·lules HepG2 són les úniques cèl·lules hepàtiques humanes que expressen i secreten SHBG al medi cel·lular i ha estat la línia cel·lular més utilitzada per l'estudi de la regulació hepàtica de la SHBG *in vitro*. També s'ha detectat presència de la SHBG al líquid cerebroespinal [65] i a la saliva [66].

### 1.1.3.1.1. Expressió de la SHBG hepàtica

El transcrit de la SHBG generat al fetge està compost pels exons que comprenen des de l'1 al 8, codifica per la proteïna precursora de la forma de la SHBG que es troba circulant en plasma i la seva expressió està regulada pel PL.



**Figura 4:** Esquema del transcrit de la SHBG que s'expressa al fetge. La posició de cada nucleòtid es troba al dalt, en blanc, i a sota es mostra la posició dels aminoàcids. Els exons en blanc són els que es conserven i en groc els exons que poden presentar *alternative splicing*. En vermell, la regió de l'exó 1 que inclou el polipèptid senyal de secreció, una regió no traduïda i els tres residus N-terminals de la SHBG madura. Els exons del 2-5 codifiquen pel domini LG de l'extrem N-terminal, en negre, els residus responsables de la unió a esteroide, en blau marí, els residus responsables del domini de dimerització i, en fúcsia, la seqüència del decapeptid d'unió al  $R_{SHBG}$ . En forma d'estrella es marquen els llocs de glicosilació. Els exons del 6-8 codifiquen pel domini LG de l'extrem C-terminal. A sota, en negre, es mostra el transcrit que s'expressa al fetge. Figura modificada de: *Nakhla AM. BMC Mol Biol. 2009 May 5;10:37.*

L'exó 1 del transcrit generat al fetge conté una regió en posició 5' que no es tradueix, els tres últims residus de l'extrem amino-terminal de la proteïna SHBG madura i el codó ATG d'inici de transcripció en marc de lectura, sent l'únic dels exons 1 de les diferents unitats de transcripció que el presenta [44]. L'exó 1 codifica pel polipèptid ric en lisines de 29 aminoàcids, els quals corresponen al

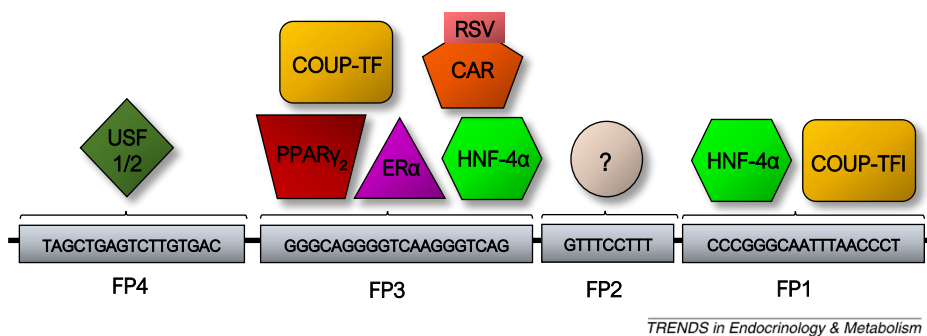
polipèptid senyal de secreció (**Figura 4**) [46]. Durant la maduració de la proteïna, el polipèptid senyal de secreció es desprèn al citoplasma i la SHBG se secreta a la sang on circula com una proteïna homodimèrica glicosilada de 92.5 kDa [20]. Els exons compresos entre el 2 i el 5 codifiquen pel domini *laminin G-like* (d'ara en endavant, domini LG) de l'extrem N-terminal, sent l'exó 3 i 4 els que codifiquen pels residus responsables de la unió a esteroide i de la dimerització de la proteïna [67–70] i, l'exó 3, el que codifica pels residus 48-57, els quals són els responsables de la unió de la SHBG amb el seu receptor ( $R_{SHBG}$ ) (**Figura 4**) [71]. Els exons del 6 al 8 codifiquen pel domini LG de l'extrem C-terminal on hi ha dos llocs de *N*-glicosilació als residus d'asparagina en posició 351 i 367 (Asn351 i Asn367) i també existeix un lloc de *O*-glicosilació al residu treonina 7 (Thr7) [45,72]. Més endavant, s'explicarà l'estructura proteica de la SHBG hepàtica en detall.

#### 1.1.3.1.2. Regulació transcripcional del $P_L$

L'expressió de la *SHBG* hepàtica està regulada pel  $P_L$ , el qual ha estat ben estudiat i caracteritzat. Aquest promotor està situat a 850 parell de bases (pb) de l'exó 1 i no conté la típica caixa TATA (*TATA-box*) que donaria lloc a l'inici de la transcripció, però compta amb múltiples llocs d'unió a factors de transcripció [8,46]. Mitjançant estudis de *DNAase I footprinting* s'han pogut descriure fins a 17 regions que regulen en *cis*, les quals s'han anomenat regions *footprint* (FP) [53,73], però les més ben caracteritzades i estudiades són les compreses entre el FP1 fins al FP4, ja que són les que presenten més activitat en les cèl·lules HepG2 [7].

Com es pot observar a la **Figura 5**, el FP1 és una regió situada 20 pb *upstream* del lloc d'inici de la transcripció, la qual és rica en TA i conté la seqüència TTTAAC, seqüència que facilita l'assemblatge de la maquinària transcripcional i sembla que substitueixi a la típica caixa TATA. En aquesta regió s'ha descrit la unió de dos factors de transcripció, els quals són responsables de la transcripció basal de la SHBG al fetge, que competeixen per la unió a la mateixa seqüència que conté un lloc de repetició directa 1 (DR1), el qual consisteix en dos hexàmers

repetits separats per un nucleòtid, normalment una adenosina. Un d'aquests factors de transcripció és el factor nuclear 4 alfa d'hepatòcit (HNF-4 $\alpha$ : *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha*), el qual sembla que substitueixi a la proteïna d'unió a TATA (TBP: *TATA binding protein*), ja que és el responsable de reclutar la maquinària transcripcional en aquesta regió i activar la transcripció de la SHBG [73]. A la mateixa seqüència del FP1 s'hi uneix el factor de transcripció *upstream* de l'ovoalbúmina de pollastre I (COUP-TFI: *Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I*), també anomenat NR2F2 (de les seves sigles en anglès *Nuclear Receptor subfamily 2, group F, member 2*), el qual bloqueja la unió d'HNF-4 $\alpha$  i reprimeix l'expressió basal de la SHBG [73,74].



**Figura 5:** Regulació transcripcional del promotor proximal o P<sub>L</sub>. Al P<sub>L</sub> de la SHBG existeixen fins a 17 regions que regulen en *cis*. En aquesta figura es mostren les regions que comprenen des del FP1 al FP4, les més ben caracteritzades. L'HNF-4 $\alpha$  i el COUP-TFI s'uneixen a la regió del FP1, el primer activa l'expressió gènica i el segon la reprimeix. No es coneix cap factor de transcripció que s'uneixi al FP2. L'ER $\alpha$ , l'HNF4 $\alpha$ , el CAR i el PPAR $\gamma$  poden unir-se al FP3 que conté un motiu DR1. Els tres primers activen l'expressió gènica, mentre que, l'últim l'inhibeix. Al FP4 s'ha descrit la unió d'USF1/2, però aquest factor té poc impacte amb l'expressió hepàtica de la SHBG. Figura modificada de: Simó R, et al. *Trends Endocrinol Metab.* 2015 Jul;26(7):376-83.

El FP3 es localitza a 50 pb del lloc d'inici de la transcripció de la SHBG i també hi ha un motiu DR1. S'ha descrit la unió de diversos factors de transcripció, entre ells HNF-4 $\alpha$  i COUP-TFI, el primer activa l'expressió i el segon l'inhibeix [73,74]. També s'ha descrit la unió del receptor d'estrògens alfa (ER $\alpha$ : *Estrogen receptor alpha*) que activa l'expressió de la SHBG [48] i del receptor constitutiu d'androstà (CAR: *Constitutive androstane receptor*), el qual, quan uneix al resveratrol (RSV), s'uneix al motiu DR1 del FP3 i activa l'expressió de la SHBG



[75]. Contràriament, també s'ha descrit la unió del receptor activat per proliferadors de peroxisoma gamma (PPAR $\gamma$ : *Peroxisome proliferator activated receptor gamma*), el qual reprimeix l'expressió de la SHBG (Figura 5) [76]. Al FP3 del promotor de la SHBG s'hi poden unir potencialment altres receptors nuclears, com per exemple el receptor X hepàtic (LXR: *Liver X Receptor*) o el receptor X de farnesoide (FXR: *Farnesoid X Receptor*), competint tots ells pels mateixos llocs d'unió on s'uneixen HNF-4 $\alpha$  i PPAR $\gamma$  [27].

Finalment, al FP4 s'ha caracteritzat un lloc d'unió dels factors de transcripció estimulats corrent amunt (USF: *Upstream stimulatory factors*), la unió dels quals sembla que no sigui indispensable per l'expressió de la SHBG hepàtica (Figura 5) [44], però, com es veurà en el següent apartat, sí que té repercussió en l'expressió de la SHBG als testicles.

A uns 800 pb amunt del promotor proximal, entre el FP16 i el FP17, s'ha observat una regió que regula l'expressió de la SHBG. Aquesta regió conté una repetició en tàndem (TAAAA) $_n$ , que quan es troba sis vegades repetida reprimeix l'expressió de la SHBG [77]. A més, al FP2, al FP5 i al FP6 s'han identificat possibles llocs d'unió de factors de transcripció, tot i això, encara no se n'ha descrit i caracteritzat cap. Amb tot, la regulació de l'expressió de la SHBG hepàtica podria ser encara més complexa del que es coneix fins al moment. Més endavant, s'aprofundeix en detall amb els factors de transcripció, així com, amb els polimorfismes descrits que regulen l'expressió hepàtica de la SHBG.

#### 1.1.3.1.3. Expressió de la SHBG testicular

L'expressió de la SHBG humana als testicles està regulada pel P $_T$ , el qual està situat a 1.9 kb *upstream* del P $_L$ . En humans, l'expressió de la SHBG als testicles es dona a les cèl·lules germinals dels testicles [51] i s'ha observat que es generen dos transcrits diferents. Els dos transcrits presenten un exó 1 alternatiu: l'exó A1. Aquest exó no conté la seqüència del pèptid senyal de secreció, per tant, la SHBG sintetitzada als testicles no se secreta i s'acumula dins de les cèl·lules germinals, concretament, a l'acrosoma [53]. L'exó A1 tampoc presenta cap ATG en marc de lectura i es creu que l'inici de la transcripció es dona a l'ATG situat a

l'exó 2 a la metionina número trenta [8]. La diferència entre els dos transcrits detectats als testicles és que un d'ells presenta la resta d'exons, del 2 al 8, amb normalitat. Per contra, l'altre transcrit detectat no presenta els 208 pb de l'exó 7 i es creu que aquest transcrit generaria una proteïna truncada que seria degradada ràpidament [51]. La funció de la SHBG testicular encara és desconeguda, tot i que es creu que pot ser clau en la maduració de l'esperma ja que pot unir amb gran afinitat a esteroides sexuals. A més, s'ha observat que la concentració de la SHBG disminueix amb l'edat i correlaciona positivament amb la motilitat de l'esperma [78].

### 1.1.3.2. Expressió de la *Shbg* en ratolins

A diferència dels humans, els ratolins només expressen la *Shbg* al fetge de forma transitòria durant l'etapa fetal [23]. En edat adulta no hi ha expressió de la *Shbg* en aquest òrgan i, per tant, tampoc s'observa presència de la *Shbg* a la sang d'aquests animals. Es creu que l'expressió del gen de la *Shbg* és clau durant el desenvolupament fetal del fetge, ja que és l'únic moment que els ratolins i altres rosegadors l'expressen en aquest teixit [44].

Els ratolins expressen la *Shbg* a les cèl·lules de Sertoli dels tubs seminífers dels testicles, la secreten al fluid seminal i allà, és transportada a l'epidídim per ser internalitzada a les cèl·lules epitelials [79]. La *Shbg* expressada als testicles dels ratolins és una proteïna homòloga a la SHBG humana i comparteixen la mateixa seqüència d'aminoàcids, però es diferencien en la glicosilació de la proteïna [24,80]. La *Shbg* té la funció de mantenir elevats els nivells d'andrògens als testicles i a l'epidídim i de transportar els esteroides sexuals per regular l'espermatogènesi, a més, s'ha utilitzat com a marcador del funcionament de les cèl·lules de Sertoli [79,81].

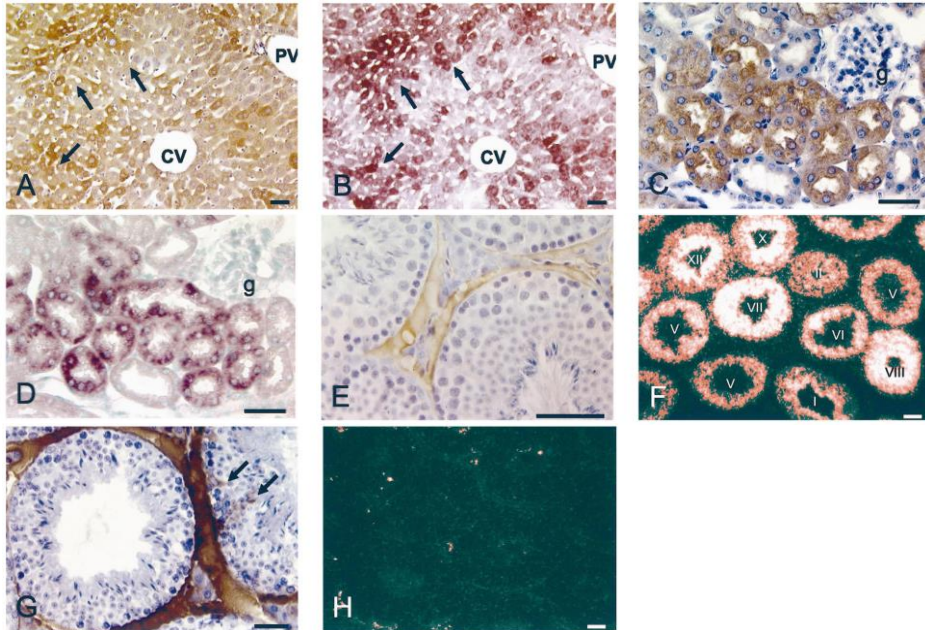
La diferència en l'expressió de la SHBG entre humans i ratolins és deguda a l'evolució del promotor de la SHBG. Els rosegadors expressen la SHBG a les cèl·lules de Sertoli [52], i no a les cèl·lules germinals dels testicles com ho fan els humans [51], degut a l'aparició durant l'evolució del FP4 al P<sub>L</sub> i del promotor alternatiu P<sub>T</sub>, els quals estan presents en la zona del promotor del gen de la SHBG



Jänne *et al.* (1998) van generar dues línies de ratolins transgènics per la *SHBG* humana diferents mitjançant la inserció per microinjecció de diferents transgens al nucli d'embrions de ratolí. Els ratolins que van ser anomenats *shbg4* se'ls hi va introduir un transgen de 4,3 kb que contenia la seqüència codificant dels vuit exons de la *SHBG* i 0,85 kb de l'ADN flanquejant a 5', és a dir, la regió del P<sub>L</sub> [54]. L'altre línia de ratolins generats es va anomenar *shbg11*, ja que se'ls hi va introduir un transgen d'11 kb, el qual contenia la regió amb els vuit exons de la *SHBG* i 5 kb d'ADN de la regió flanquejant a 5', corresponents a la seqüència dels exons 1 alternatius que ja havien estat identificats als testicles humans [23,54].

Els dos models de ratolins transgènics per la *SHBG* humana presentaven expressió de la *SHBG* humana al fetge, aquest fet va fer concloure que tota la informació necessària per expressar la *SHBG* al fetge es troba compresa al transgen de 4,3 kb, on només hi ha 0,85 kb de la regió 5' *upstream* de l'exó 1, la qual correspon al P<sub>L</sub> [54].

Com es pot observar a la **Figura 7A i 7B**, l'expressió hepàtica de la *SHBG* es dona als hepatòcits i s'observa més expressió als hepatòcits de la regió periportal dels lòbuls hepàtics que als hepatòcits que rodegen la vena central. Aquests animals també presenten *SHBG* a la sang, tot i que en concentracions deu vegades més elevades que les detectades en el plasma dels humans [54]. També hi ha expressió de la *SHBG* humana al ronyó de les dues línies de ratolí generades, per tant, l'expressió al ronyó estaria regulada pel mateix promotor que regula l'expressió de la *SHBG* al fetge, és a dir, el P<sub>L</sub>. Concretament, i com es pot veure a la **Figura 7C i 7D**, la *SHBG* es localitza al citoplasma de les cèl·lules epitelials del túbul contort proximal i la proteïna és secretada, ja que compta amb l'exó 1 amb el pèptid senyal de secreció, a més, s'ha observat presència de la *SHBG* humana a l'orina dels animals transgènics per la *SHBG* humana [54].



**Figura 7:** Localització cel·lular de la SHBG humana als ratolins transgènics per la *SHBG* humana. (A) Localització de la SHBG humana immunoreactiva als hepatòcits dels ratolins *shbg11*. (B) Expressió de l'ARNm de seqüències *antisense* de SHBG dels mateix animal que en (A). (C) Localització de la SHBG humana immunoreactiva en ronyó d'animals *shbg11*. (D) Expressió de l'ARNm de seqüències *antisense* de SHBG dels mateix animal que en (C). (E) Immunoreacció de la SHBG humana en testicles de ratolins *shbg11*. (F) Imatges en micrògrafs en camp fosc de seqüències *antisense* de SHBG en els testicles del mateix animal que en (E). (G) Immunoreacció de la SHBG humana en testicles de ratolins *shbg4*. (H) Imatges en micrògrafs en camp fosc de seqüències *antisense* de SHBG en els testicles del mateix animal que en (G). CV: vena central; PV: vena portal; Fletxes: regions periportals. g: posició d'un glomèrul. Imatge modificada de: Jänne M, et al. *Mol Endocrinol* 1998 Jan;12(1):123-136

Pel que fa als testicles, es va detectar presència de la proteïna SHBG humana als testicles de les dues línies d'animals transgènics generades, com es pot observar a les **Figura 7E i 7G**, però només es va observar expressió de la *SHBG* huamana als animals *shbg11* (**Figura 7F i 7H**), els quals contenien la informació dels exons 1 alternatius. A més, els transcrits detectats als testicles contenien la seqüència de l'exó A1 alternatiu i es va observar que l'expressió de la SHBG humana varia segons l'estadi de l'espermatogènesi [54]. Posteriorment, es va identificar que l'expressió de la *SHBG* humana als testicles dels ratolins transgènics per la *SHBG* humana es donava a les cèl·lules germinals dels testicles

i no a les cèl·lules de Sertoli [51]. A més, l'any 2005 Selva *et al.* (2005) van observar que la unió d'USF1/2 a la regió del FP4 reprimeix l'expressió de la *SHBG* humana a les cèl·lules de Sertoli [52], ja que la deleció de la regió d'unió d'USF1/2 del FP4 del promotor proximal dels ratolins transgènics *shbg4* activava l'expressió de la *SHBG* humana a les cèl·lules de Sertoli [52]. A més, els ratolins *shbg4* amb aquesta deleció seguien expressant la *SHBG* humana al fetge, posant de manifest que aquesta zona no és necessària per mantenir l'expressió hepàtica de la *SHBG* [52,82].

Fenotípicament els ratolins transgènics per la *SHBG* humana, tant els *shbg4* com els *shbg11*, no presenten diferències respecte els *wild-type* (WT) en el pes total ni en el pes dels òrgans on s'observa expressió de la *SHBG*, com el fetge, els testicles o els ronyons. Tampoc es van observar diferències en la quantitat o morfologia de l'esperma dels ratolins mascles transgènics per la *SHBG* humana ni en la fertilitat d'aquests respecte als ratolins WT [54].

Gràcies als ratolins transgènics per la *SHBG* humana s'han pogut identificar les diferents unitats transcripcionals teixit-específiques del promotor de la *SHBG*. El ratolí *shbg4*, que d'aquí en endavant serà anomenat genèricament ratolí transgènic per la *SHBG* humana, ha estat el més utilitzat per l'estudi de la regulació hepàtica de la *SHBG* humana, gràcies a que la *SHBG* humana en aquests ratolins està regulada pel seu propi promotor ( $P_L$ ). Per tant, amb el ratolí transgènic per la *SHBG* humana s'ha pogut analitzar *in vivo* la regulació hepàtica de la *SHBG* humana i descobrir nous factors de transcripció implicats en aquesta regulació.

#### **1.1.4. Factors de transcripció que regulen l'expressió de la *SHBG* hepàtica**

S'han identificat diversos factors de transcripció que regulen l'expressió hepàtica de la *SHBG*. Variacions dels nivells de cadascun d'ells poden contribuir a canvis en l'expressió hepàtica de la *SHBG*. A continuació, s'expliquen en detall els diversos factors de transcripció que s'uneixen a diferents regions de FP del  $P_L$  de la *SHBG* i que ja han estat descrits prèviament.

#### 1.1.4.1. HNF-4 $\alpha$

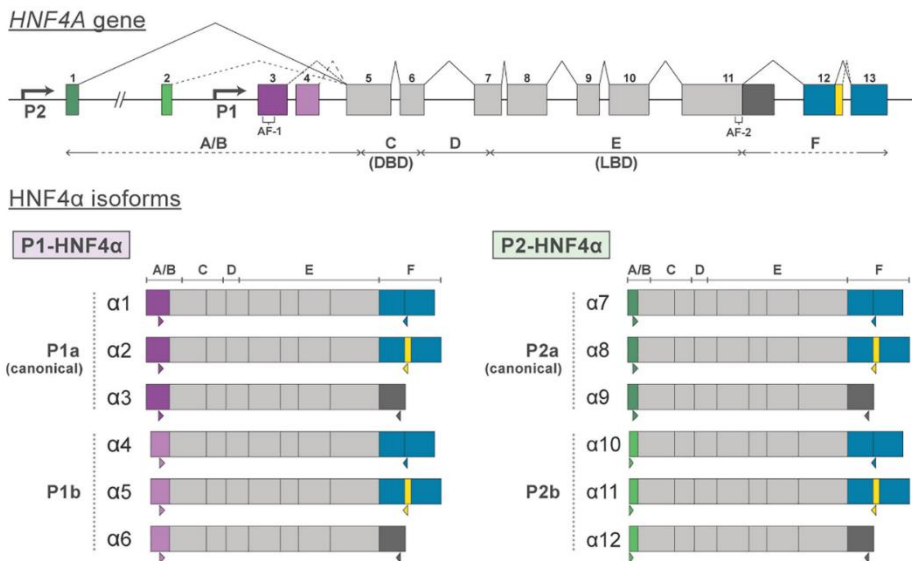
L'HNF-4 $\alpha$  és considerat el factor de transcripció principal que regula l'expressió hepàtica de la SHBG. L'HNF-4 $\alpha$  compta amb dos llocs d'unió al promotor proximal de la SHBG, s'uneix a les regions DR1 del FP1 i del FP3 (Figura 5) i activa l'expressió de la SHBG [73].

L'HNF-4 $\alpha$ , també anomenat NR2A1 (de les seves sigles en anglès *Nuclear Receptor subfamily 2, group A membre 1*), és un receptor nuclear altament conservat, membre de la superfamília de receptors nuclears dependents de lligand [83] i considerat un factor de transcripció enriquit al fetge essencial pel manteniment del fetge, tant fetal com adult [84]. Durant anys, l'HNF-4 $\alpha$  va ser classificat com un receptor nuclear orfe, ja que no s'havia identificat el seu lligand, però l'any 2009 Yuan *et al.* van descriure l'àcid linoleic com el seu lligand endogen [85]. Tot i això, la unió d'aquest lligand és reversible i no és necessària perquè l'HNF-4 $\alpha$  iniciï la transcripció dels seus gens diana [85]. L'HNF-4 $\alpha$  reconeix i s'uneix a llocs DR1, però també reconeix, amb més baixa afinitat, llocs de repetició directe 2 (DR2), és a dir, hexàmers repetits separats per dos nucleòtids [86].

Molts dels gens que l'HNF-4 $\alpha$  regula estan involucrats en el transport i metabolisme de nutrients, en l'hematopoesi, en la detoxificació de drogues i de xenobiòtics, en la resposta immunitària i en la diferenciació hepàtica [84,87–90]. En humans, l'HNF-4 $\alpha$  està codificat pel gen *HNF4A* i es troba expressat majoritàriament al fetge, als ronyons i al tracte intestinal [83], tot i que també hi ha expressió al pàncreas, a l'estómac i a l'endoderma visceral de l'embrió en desenvolupament [83,84,91].

S'han descrit fins a dotze variants transcripcionals o isoformes d'HNF-4 $\alpha$ , tant en humans com en ratolins [92–94]. Son dos promotors, separats per 46 kb, els responsables de l'expressió de les diferents isoformes descrites: el promotor proximal, anomenat P1, i el promotor distal, anomenat P2. Les isoformes HNF-4 $\alpha$ (1-6) o P1-HNF-4 $\alpha$ , s'expressen sota la regulació del promotor proximal P1, en canvi, les isoformes HNF-4 $\alpha$ (7-12) o P2-HNF-4 $\alpha$ , son expressades sota la regulació del promotor distal P2 (Figura 8) [94].

Les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$  i P2-HNF-4 $\alpha$  es diferencien per la regió N-terminal, concretament, per la regió A/B (Figura 8). Aquesta regió conté el domini AF-1 de transactivació, que s'activa independentment d'unió amb lligand i permet la unió de correguladors o d'altres factors de transcripció [95]. Les isoformes P2-HNF-4 $\alpha$  no presenten el domini AF-1 [94,96,97] i s'ha descrit, en diversos contextos, que aquests isoformes presenten un poder transcripcional menor que les isoformes canòniques P1-HNF-4 $\alpha$  [94,98].



**Figura 8:** Expressió de les 12 isoformes conegudes d'HNF-4 $\alpha$  regulades pel promotor proximal P1 o el promotor distal P2. Les isoformes HNF-4 $\alpha$ (1-6) estan regulades pel promotor P1 i les isoformes HNF-4 $\alpha$ (7-12) es troben sota la regulació del promotor P2. Diversos esdeveniments de *splicing* alternatiu generen les dotze isoformes descrites. Figura extreta de: Lambert É, et al. *Mol Cell Proteomics*. 2020 May;19(5):808-827.

Les isoformes HNF-4 $\alpha$ (4-6), anomenades P1b, també presenten un poder transcripcional menor respecte les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$  canòniques. Com es pot observar a la Figura 8, les isoformes P1b tampoc contenen el domini AF-1 a la seva regió A/B [94]. L'altra diferència entre les dotze isoformes detectades està situada a l'extrem C-terminal [94], tot i això, el domini AF-2, una segona regió de transactivació, està present en totes les isoformes d'HNF-4 $\alpha$  [94]. En un estudi, Briançon i Weiss (2006) van generar dues línies de ratolins, una d'elles només expressava específicament l'isoforma P1 HNF-4 $\alpha$ 1 i, l'altra, l'isoforma P2 HNF-4 $\alpha$ 7 al fetge. Com es pot veure a la Figura 8, aquests dues isoformes només es



diferencien pel domini A/B, presentant la primera la regió AF-1 i la segona no [99]. En aquest estudi es va observar una expressió diferencial de certs gens diana d'HNF-4 $\alpha$ , demostrant que alguns d'ells son dependents del domini AF-1 [99].

L'expressió de cada isoforma és depenent de teixit, però encara no se sap ben bé la funció de cada una d'elles, a més, l'HNF-4 $\alpha$  pot formar homodímers entre dues isoformes iguals, però també heterodímers entre isoformes diferents, repercutint en l'activació o repressió dels seus gens diana [100]. Al fetge adult se hi predomina l'expressió de les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$ , en canvi, durant el desenvolupament fetal, s'observa expressió tant de les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$  com de les P2-HNF-4 $\alpha$  [101]. A més, durant el desenvolupament del carcinoma hepatocel·lular o hepatocarcinoma (HCC: *Hepatocellular carcinoma*) s'ha descrit un augment de les isoformes P2-HNF-4 $\alpha$  i una disminució de les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$  [102,103].

L'HNF-4 $\alpha$  és un dels factors de transcripció essencials per l'expressió hepàtica de la SHBG [73]. Diversos estudis han demostrat que la modificació dels nivells d'HNF-4 $\alpha$  és una de les vies principals per augmentar o disminuir els nivells d'expressió de la SHBG al fetge [104–108], tot i això, no se sap la implicació de les diferents isoformes d'HNF-4 $\alpha$  en aquesta regulació.

#### 1.1.4.2. PPAR $\gamma$

El PPAR $\gamma$ , juntament amb l'HNF-4 $\alpha$ , és un dels factors de transcripció principals que regulen l'expressió de la SHBG hepàtica. El PPAR $\gamma$  s'uneix a la regió del FP3 del promotor de la SHBG, competint amb altres factors de transcripció, i reprimeix l'expressió hepàtica de la SHBG (Figura 5) [76].

El PPAR $\gamma$  forma part de la família de receptors nuclears activats per proliferadors del peroxisoma (PPAR), on també hi formen part el PPAR $\alpha$  i el PPAR $\delta$ - $\beta$ . Aquests factors estan involucrats en la regulació transcripcional de gens implicats en el metabolisme dels lípids, el balanç energètic, la homeòstasis de la glucosa i la inflamació, entre molts altres processos [109].

El PPAR $\gamma$  pot estar activat per diversos lligands, entre ells, els metabòlits de l'àcid araquidònic [110]. Tot i això, també el poden activar compostos exògens, com per exemple els disruptors endocrins químics [111].

Es coneixen tres isoformes de PPAR $\gamma$  generades per *splicing* alternatiu: PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2 i PPAR $\gamma$ 3, les quals es troben altament expressades al teixit adipós on son inductors de la diferenciació dels adipòcits [112,113]. El PPAR $\gamma$  també es troba expressat al fetge en diversos tipus cel·lulars. Als hepatòcits, el PPAR $\gamma$  és responsable de la regulació de gens implicats en el metabolisme dels lípids. Entre els seus diana es troben l'àcid gras sintasa (FAS) i l'acetil CoA carboxilasa (ACC1), els quals estan involucrats amb la lipogènesis *de novo* (DNL: *de novo lipogenesis*). PPAR $\gamma$  també controla l'expressió de la proteïna d'adipòcit 2 o també anomenada proteïna d'unió a àcid gras (aP2 o FABP4) i la translocasa d'àcid gras CD36, les quals estan implicades amb la importació d'àcids grassos lliures [114].

S'ha observat que l'isoforma PPAR $\gamma$ 2 té una activitat transcripcional entre cinc i deu vegades major que PPAR $\gamma$ 1 [115]. En aquest sentit, Selva *et al.* (2009) van observar que la sobreexpressió de la variant PPAR $\gamma$ 2 Pro12 era més efectiva reduint els nivells de la SHBG que la variant PPAR $\gamma$ 2 Ala12, degut a que la variant PPAR $\gamma$ 2 Pro12 presenta una activitat d'unió a elements de resposta a PPAR $\gamma$  major que la variant PPAR $\gamma$ 2 Ala12 [76].

Els nivells d'expressió de l'isoforma PPAR $\gamma$ 2 es troben augmentats als fetges de models animals d'obesitat i d'esteatosi hepàtica [116–119] i existeix una correlació positiva entre l'acumulació de greix hepàtic i els nivells d'expressió de PPAR $\gamma$ 2 en humans [120]. En aquestes condicions patològiques, com és l'obesitat i la esteatosi hepàtica, la qual pot forma part de la malaltia del fetge gras no alcohòlica (NAFLD: *Non-alcoholic fatty liver disease*), també s'observen nivells plasmàtics disminuïts de la SHBG, provocats per un augment dels nivells de PPAR $\gamma$  i una disminució dels nivells d'HNF-4 $\alpha$  [121], aquest fet s'explicarà en detall més endavant.

#### 1.1.4.3. COUP-TFI

Al promotor de la SHBG s'han identificat dos llocs d'unió al factor de transcripció COUP-TF, un situat al FP1, competint amb l'HNF-4 $\alpha$  per l'expressió basal de la SHBG, i l'altre situat al FP3, on s'hi uneixen diversos factors de transcripció [48]. La unió de COUP-TF al promotor de la SHBG en reprimeix la seva expressió hepàtica [73].

Els COUP-TFs son membres de la superfamília dels receptors nuclears orfes, ja que no se n'ha identificat un lligand. En vertebrats, s'han identificat tres gens homòlegs de COUP-TF: el COUP-TFI, també anomenat receptor nuclear de la subfamília 2 grup F membre 1 (*NR2F1*), el COUP-TFII, anomenat també receptor nuclear de la subfamília 2 grup F membre 2 (*NR2F2*) i el COUP-TFIII, el qual s'ha anomenat receptor nuclear de la subfamília 2 grup F membre 6 (*NR2F6*), sent aquest últim el més divergent dels tres [122,123]. Els COUP-TFs estan involucrats en molts processos biològics, com per exemple en l'organogènesi, el metabolisme energètic i, al fetge, COUP-TFII controla gens involucrats en la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos i del metabolisme de la glucosa [122].

Els COUP-TFs poden activar o reprimir l'expressió de manera gens-específica unint-se al DR AGGTCA [124] i poden interferir en la transactivació d'altres factors de transcripció, tant unint-se al seu lloc d'unió al promotor dels gens diana d'aquests factors, com segrestant el receptor X de retinoides (RXR: *Retinoid X receptor*) impedit que dimeritzi amb altres factors de transcripció [122,125]. En el cas del promotor de la SHBG, el COUP-TF ocupa els mateixos llocs d'unió que l'HNF-4 $\alpha$  al FP1 i al FP3, per tant, competeix per aquests llocs d'unió i quan el COUP-TF està unit al promotor, es reprimeix l'expressió de la SHBG al fetge [73].

#### 1.1.4.4. USF

Els factors de transcripció USF1/2 son membres de la família dels factors de transcripció caracteritzats pel domini bàsic hèlix-*loop*-hèlix (bHLH), els quals s'uneixen a seqüències d'ADN amb motius coneguts com caixes-E (CACGTG)

[126,127]. Els USFs poden formar homodímers o heterodímers [127] i activen nombrosos gens com per exemple a la piruvat quinasa [128], al col·lagen tipus 1 [129] i a la FAS [130].

La unió d'USF1/2 al FP4 del promotor de la SHBG humana reprimeix l'expressió de la SHBG a les cèl·lules de Sertoli, sent el responsable de les diferències d'expressió de la *SHBG/Shbg* que existeixen entre espècies [52]. En canvi, al fetge, la unió d'USF1/2 activa lleugerament l'expressió de la SHBG, encara que aquesta unió no és necessària per mantenir l'expressió hepàtica basal de la SHBG [52,82].

#### 1.1.4.5. ER $\alpha$

L'ER $\alpha$  és un receptor nuclear activat per lligand, el qual s'activa per la unió dels estrògens, forma homodímers i s'uneix als elements de resposta a estrògens que es troben als promotors del seu gen diana. Tot i això, l'ER $\alpha$  també pot associar-se a altres factors de transcripció per corregular gens [131,132]. L'ER $\alpha$  regula la transcripció de múltiples gens en diferents teixits, com per exemple als teixits reproductius, al cervell, als ossos o al teixit adipós [133–136].

Al FP3 del promotor de la SHBG s'ha descrit un lloc d'unió d'ER $\alpha$ , el qual activaria l'expressió de la SHBG [48], sent ER $\alpha$  l'intermediari de l'augment de la SHBG observat després del tractament amb estrògens [137].

#### 1.1.4.6. CAR

El CAR forma part de la superfamília de receptors nuclears i també s'anomena receptor nuclear de la subfamília 1, grup I, membre 3 (NR113). Coordina la resposta cel·lular a l'estímul de químics, tant endògens com exògens, regulant l'expressió dels seus gens diana i la seva funció principal és la regulació del metabolisme de xenobiòtics i la detoxificació i neteja de químics al fetge [138,139]. El CAR controla l'expressió de molts gens dels enzims del citocrom P450 (CYPs). Per exemple, el CAR induïx l'expressió dels gens *CYP2B6*, *CYP3A4*, *CYP2Cs*, els quals són responsables de metabolitzar al fetge múltiples

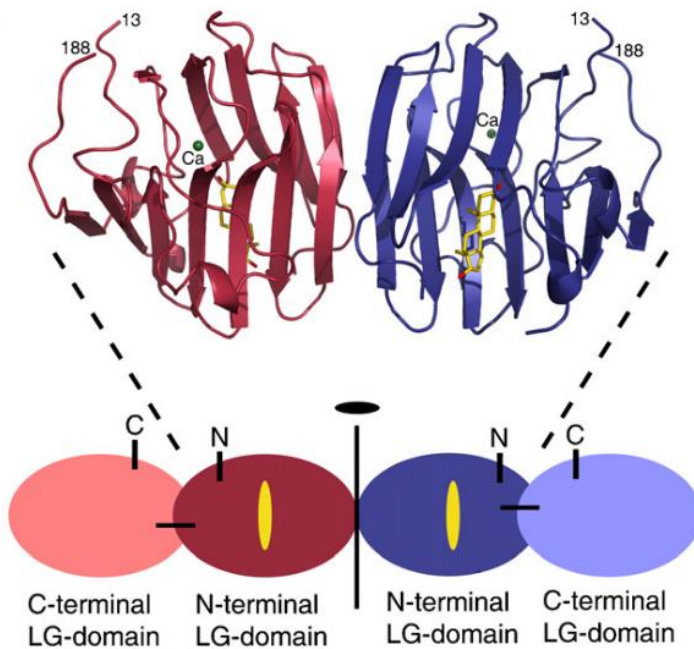
drogues i químics [140]. Altres gens diana del CAR són els enzims uridina-difosfat glucuroniltransferasa (*UGT*) [141]. El CAR també modula diverses funcions hepàtiques com l'homeòstasi energètica i regula l'expressió de gens implicats en el metabolisme, com la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (*PEPCK*) o la glucosa-6-fosfatasa (*G6Pase*), entre d'altres [142].

Per regular l'expressió gènica, el CAR s'activa per múltiples químics xenobiòtics [143] i, un cop activat, dimeritza amb RXR al nucli per unir-se a les seqüències anomenades elements de resposta a xenobiòtics, usualment compostes per dues repeticions directes de la seqüència AG(G/T)TCA [144]. Tot i això, el CAR pot activar-se indirectament, ja que existeixen lligands que activen la translocació del CAR al nucli sense unir-se a ell, com per exemple el fenobarbital [145]. També s'ha observat que el CAR competeix amb l'HNF-4 $\alpha$  per la unió a elements DR1 als promotors dels gens de *CYP7A1* i de *PEPCK* [146]. A més, existeix una selectivitat entre espècies dels lligands al CAR, per exemple, el xenobiòtic 1,4-bis-[2-(3,5,-dicloropiridiloxi)]-benzè (TCPOBOP) activa el Car de ratolí, en canvi, no afecta al CAR humà [147,148], aquest fet fa perillosa l'extrapolació dels resultats que es s'observen sobre el Car en models animals [141].

En un estudi previ dut a terme al nostre laboratori, mitjançant experiments *in vitro* amb cèl·lules HepG2 i experiments *in vivo* amb el ratolí transgènic per la *SHBG* humana, es va demostrar que el CAR humà activat pel RSV s'uneix al promotor de la *SHBG* a l'element DR1 (GGGTCAAGGGTCA), situat a 70 pb *upstream* del promotor proximal, i activa l'expressió de la *SHBG* [75]. Aquesta activació és específica del CAR humà, ja que el tractament amb RSV a ratolins transgènics per la *SHBG* humana no modificava l'expressió de la *SHBG* [75]. En canvi, utilitzant una nova línia de ratolins doble transgènics (transgènics per la *SHBG* humana i transgènics pel CAR humà) es va observar que el tractament amb RSV augmentava l'expressió de la *SHBG* [75]. A més, en el mateix estudi, es va observar una correlació positiva entre els nivells d'expressió hepàtics de *CAR* i de *SHBG* en biòpsies hepàtiques humanes [75].

### 1.1.5. Estructura proteica de la SHBG

La SHBG produïda als hepatòcits consisteix en 402 aminoàcids, 29 dels quals pertanyen al pèptid senyal situat a l'extrem amino-terminal (N-terminal) [20], el qual és escindit quan la proteïna es tradueix. Durant la traducció de la proteïna SHBG aquesta pateix diferents modificacions post-traduccional, entre elles diverses glicosilacions, i se secreta a la sang [11,20]. Per tant, la SHBG plasmàtica circula com un homodímer glicosilat de 92.5 kDa [30,149,150], el qual conté dos monòmers idèntics de 373 aminoàcids, de 40,5 kDa cadascun. Les dues subunitats de l'homodímer de la SHBG son capaces d'unir esteroide sexual i pot ser que un estigui ocupat i l'altre no o que els dos llocs d'unió a esteroide estiguin ocupats pel mateix o per diferents esteroïdes sexuals [151].



**Figura 9:** Estructura proteica de la SHBG i els seus dominis. El domini LG de l'extrem N-terminal, on hi ha el lloc d'unió a esteroide (en groc), està compost des de l'aminoàcid 13 al 188. Figura adaptada de: Avvakumov, GV, et al. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Mar 5;316(1):13-23.

Gràcies als estudis de cristal·lització, els dominis que componen la SHBG han estat caracteritzats, tot i que només s'ha pogut cristal·litzar la SHBG en complex amb diferents esteroïdes sexuals o altres lligands, ja que la unió estabilitza la formació de l'homodímer [31]. Cada monòmer de la SHBG conté dos dominis *laminin G-like* (dominis LG) situats als dos extrems [31,70], els quals es col·loquen de manera oposada i s'uneixen pels dominis LG de l'extrem N-terminal (Figura 9) [31].

El domini LG de l'extrem N-terminal està codificat pels exons 2-5. En aquest domini hi ha situat el lloc d'unió a esteroïde, el domini de dimerització [152], un lloc d'unió a calci que estabilitza la formació de l'homodímer, dos llocs d'unió a zinc, un dels quals influeix en la especificitat d'unió a esteroïde, i un lloc d'O-glicosilació [31]. Per altra banda, el domini LG de l'extrem carboxiterminal (C-terminal) conté llocs altament conservats de N-glicosilació [70,150,153].

#### 1.1.5.1. Lloc d'unió a esteroïde

Al domini LG de l'extrem N-terminal hi ha situat el lloc d'unió a esteroïde [70], el qual està altament conservat en tots els vertebrats, incloent una serina (que en humans està situada a la posició Ser42) que està situada al fons de la butxaca d'unió i és essencial per la unió a esteroïde [44]. L'esteroïde sexual es troba al centre del domini LG N-terminal i s'intercala al fons hidrofòbic format per dues làmines beta [31], per tant, els esteroïdes sexuals queden profundament enterrats al fons de la butxaca d'unió i només el 2% de l'esteroïde sexual és accessible des de l'exterior [31]. La majoria de residus del lloc d'unió a esteroïde són hidrofòbics, però també es duen a terme ponts d'hidrogen.

No tots els esteroïdes sexuals s'uneixen a la SHBG en la mateixa orientació. Els andrògens s'uneixen per un pont d'hidrogen entre els grups funcionals a la posició C3 de l'anell A dels andrògens [154] i el grup hidroxil de la Ser42 de la SHBG, en canvi, els estrògens realitzen aquest pont d'hidrogen entre el grup hidroxil C17 de l'anell D [30,154]. Per tant, els andrògens i els estrògens, a l'unir-se a la SHBG, queden en orientacions contràries. Aquesta diferència pot ser de gran importància, ja que altera la posició d'un *loop* que es troba prop de

l'entrada al lloc d'unió a esteroide [31] i s'indueixen canvis als residus que queden exposats a la superfície de la proteïna, fet que podria influir en les interaccions entre la SHBG amb altres proteïnes o macromolècules de manera lligand-dependent [31].

Diversos disruptors endocrins es poden unir a la SHBG, com per exemple algunes flavonones, calcones, ftalats, parabens, derivats de les benzofenones, derivats de difeniletilens, derivats de difenilmetà, derivats de bibenzil i estilbens [155].

### 1.1.5.2. Domini de dimerització

Els monòmers de la SHBG posseeixen una gran afinitat entre ells, per aquesta raó, dimeritzen quan se sintetitzen i son secretats en forma d'homodímer [44,68]. La dimerització és necessària per formar el lloc d'unió a esteroide [68], ja que cada monòmer forma la interfase de les dues làmines beta, unides per vuit ponts d'hidrogen, i forma les catorze làmines beta plegades donant lloc a la forma cilíndrica de l'homodímer madur (**Figura 9**) [151,152]. Aquest procés crea la butxaca del lloc d'unió a esteroide [68]. La unió entre els monòmers és predominantment hidrofòbica i es dur a terme en residus conservats filogenèticament: a l'alanina 85 (Ala85), la leucina 87 (Leu87), la valina 89 (Val89), la Leu122, la Leu124, l'Ala91 i la Val 121. Tot i això, també hi ha interaccions polars amb els residus de l'aspàrtic 73 (Asp73) i de l'arginina 125 (Arg125) [31].

Tant les unió de cations de calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) com de cations de zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) a la proteïna SHBG son necessàries per mantenir l'estabilitat del dímer plegat, a més, també es requereix la unió a esteroide per mantenir la integritat de l'homodímer [156]. Els llocs d'unió a metalls es troben localitzats al domini N-terminal. La unió de  $\text{Ca}^{2+}$  ajuda a estabilitzar la formació del dímer [68,70] i una unió de  $\text{Zn}^{2+}$ , situada a prop de la interfase del dímer, també ajuda al manteniment d'aquesta integritat [153]. Existeix una altre lloc d'unió a  $\text{Zn}^{2+}$ , pròxim al lloc d'unió a esteroide, que en aquest cas, afecta l'especificitat de la unió a esteroide sexual, ja que quan hi ha  $\text{Zn}^{2+}$  unit es disminueix l'afinitat de la SHBG per l'estradiol [153,154].



### 1.1.5.3. Glicosilacions

Les glicosilacions són les modificacions post-traduccionals més comunes en proteïnes extracel·lulars, ja que són necessàries en diversos processos biològics com, per exemple, per plegar la proteïna, per mantenir l'estabilitat, per l'activació del receptor o per dur a terme una secreció eficient [157,158].

La proteïna madura de la SHBG presenta tres glicosilacions. Una O-glicosilació a la treonina 7 (Thr7) del domini LG de la regió N-terminal i dues N-glicosilacions als residus d'asparagina en posició 351 i 367 (Asn351 i Asn367) del domini LG C-terminal [20,31,67,159]. A l'O-glicosilació s'hi uneix el disacàrid Gal-GalNAc, que pot unir-se a grups sialil, en canvi, als llocs de N-glicosilació s'hi uneixen una gran varietat de cadenes d'oligosacàrids.

La glicosilació de la proteïna perllonga la vida mitja en sang de la SHBG i la protegeix de les proteases, però no influeix en la unió a esteroide [31,160,161]. A més, les glicosilacions poden modificar la taxa d'aclariment de la SHBG en sang i les interaccions amb altres macromolècules [161,162]. Les glicosilacions de la SHBG també són responsables de les diferents subunitats detectades en plasma, on s'hi observen subunitats de 52 i de 48 kDa, en una relació 10:1, degut a les diferències en la utilització d'oligosacàrids a l'Asn351 i l'Asn367 [159,163].

### 1.1.6. Nivells plasmàtics de la SHBG

Totes les espècies de vertebrats, a excepció dels ocells, presenten SHBG a la sang en algun moment del seu cicle de vida [164], sent la SHBG el principal transportador d'esteroides sexuals en vertebrats.

Com es pot observar a la **Taula 1**, els nivells plasmàtics de la SHBG humana fluctuen durant tot el cicle de la vida d'una persona, a més, poden estar influenciats per alteracions fisiopatològiques, per tractaments hormonals exògens i per altres factors que s'explicaran més endavant.

**Taula 1:** Rangs de referència de les concentracions plasmàtiques de la SHBG (nM) en diferents edats en humans. Extret de *Hammond GL. Biol Reprod. 2011 Sep;85(3):431-41.*

Edat		Rang (nM)	
Infants (1-23 mesos)		60 - 252	
Prepuberal (1-8 anys)		72 - 220	
Puberal	Nois	16 - 100	
	Noies	36 - 125	
Edat adulta	Homes	20 - 60	
	Dones	Pre-menopàusica	40 - 120
		Post-menopàusica	28 - 112

### 1.1.6.1. Durant el desenvolupament fetal

En mamífers la producció hepàtica de la SHBG durant el desenvolupament fetal és un moment crític, ja que en ratolins i en rates és l'única etapa on s'ha observat expressió hepàtica de la SHBG, i per tant, presència de SHBG al plasma [23,165]. Aquest fet coincideix amb l'aparició del receptor de l'hormona luteïnitzant i dels enzims esteroïdogènics necessaris per la biosíntesi de la testosterona als testicles [166]. En conills també s'ha observat que augmenta l'expressió hepàtica de la SHBG en el fetus en el moment de producció de testosterona [167].

En humans, els nivells plasmàtics de la SHBG al fetus son similars tant en nens com en nenes així com en el líquid amniòtic [168,169]. No està ben definida la funció de la SHBG en l'etapa fetal, però es creu que podria servir per protegir als fetus femenins de l'exposició a andrògens a l'úter i de la regulació de l'acció dels andrògens en la diferenciació sexual masculina [44].

Els nivells de la SHBG al plasma de la mare augmenten de cinc a deu vegades, tant en humans com en conills, al final de l'embaràs [167,170]. Aquest augment podria protegir a la mare de l'exposició als esteroïdes sexuals produïts pel fetus durant el desenvolupament fetal [44]. Reforçant aquesta hipòtesi, hi ha un cas reportat d'una dona amb deficiència de SHBG durant l'embaràs la qual va patir androgenització i que va desaparèixer durant el postpart [171].

### 1.1.6.2. Infantesa i pubertat

En rates i en ratolins, després del naixement, no hi ha presència de la SHBG al plasma, per tant, la SHBG en rosegadors no és essencial pel transport dels esteroides sexuals [44]. La poca SHBG que es pot detectar a la sang de les rates adultes prové de les gònades.

En humans, els nivells de la SHBG a la sang del cordó umbilical al néixer son deu vegades menors que els presents a la sang de la mare, però durant les primeres setmanes de vida, els nivells plasmàtics de la SHBG van augmentant i es mantenen relativament alts fins a la pubertat, tant en nois com en noies [172]. L'augment de la SHBG en aquesta etapa vindria explicada per la maduració en la producció i l'acció de les hormones tiroïdals [173]. L'augment dels nivells plasmàtics de la SHBG durant la infantesa restringeix les accions dels esteroides sexuals en aquesta etapa [44,174].

Durant la pubertat hi ha una reducció progressiva dels nivells plasmàtics de la SHBG. La disminució dels nivells plasmàtics de la SHBG permetria la maduració de l'eix hipotalàmic-hipofisari-gonadal (HPG) [172,175]. En nois, la concentració plasmàtica de la SHBG disminueix quatre vegades, en canvi, en noies, només es redueix a la meitat [170,175]. Aquesta diferència sexual es podria explicar per una exposició diferencial als andrògens durant etapes primerenques que influeix a l'alliberació de l'hormona de creixement pituitària, generant un dimorfisme sexual en l'expressió hepàtica que pot perdurar fins l'edat adulta i/o per canvis en l'estat metabòlic durant la pubertat [44].

### 1.1.6.3. Edat adulta

En edat adulta, com es pot observar a la **Taula 1**, les dones presenten concentracions plasmàtiques de la SHBG dues vegades majors que els homes. El rang normal dels nivells plasmàtics de la SHBG en homes és de 20-60 nM, en dones pre-menopàusiques aquests nivells es doblen (40-120 nM) i baixen en dones post-menopàusiques (28-112 nM). Els nivells plasmàtics de la SHBG també augmenten durant l'embaràs, de cinc a deu vegades, degut a un augment

dels nivells dels estrògens [170]. De la mateixa manera, en dones tractades amb anticonceptius basats en estrògens sintètics també s'observa un augment de la SHBG plasmàtica [32]. Aquest increment té influències en la distribució d'andrògens i estrògens i s'ha utilitzat el tractament amb anticonceptius orals per reduir l'exposició a andrògens de dones que pateixen hirsutisme [176].

El rang de normalitat dels nivells plasmàtics de la SHBG entre individus és molt ampli, com es pot observar a la **Taula 1**, en canvi, les concentracions plasmàtiques de la SHBG en un individu adult sa es mantenen relativament constants al llarg de la vida de l'individu. Tot i això, en diverses malalties els nivells plasmàtics de la SHBG es troben alterats [177].

#### **1.1.6.4. Alteracions dels nivells plasmàtics de la SHBG en les malalties humanes**

##### **1.1.6.4.1. Desordres tiroïdals**

Els nivells plasmàtics de la SHBG es troben elevats en individus que pateixen hipertiroidisme [170]. En canvi, els individus amb hipotiroidisme presenten nivells lleugerament disminuïts de la SHBG plasmàtica [170,178,179], els quals retornen a la normalitat quan son tractats amb triiodotironina (T3) o tiroxina (T4) [178,180]. Els individus amb resistència a les hormones tiroïdals presenten nivells elevats d'hormones tiroïdals, en canvi, no s'observen modificacions en els nivells plasmàtics de la SHBG degut a l'acció defectuosa de les hormones tiroïdals al fetge d'aquests individus. Per aquest motiu, la mesura dels nivells plasmàtics de la SHBG serveix per avaluar la sensibilitat del fetge a les hormones tiroïdals [180,181].

##### **1.1.6.4.2. Obesitat**

Un dels factors que més es relaciona amb els nivells plasmàtics de la SHBG és l'índex de massa corporal (IMC), els individus prims presenten nivells plasmàtics de la SHBG més elevats que els individus que pateixen sobrepès o obesitat [182]. A més, en individus obesos tractats amb cirurgia bariàtrica

s'observa un augment de la SHBG, la qual correlaciona amb la pèrdua de pes [183,184]. En canvi, els individus que pateixen anorèxia nerviosa presenten nivells molt alts de la SHBG que es normalitzen quan recuperen pes [185]. En humans, el contingut de triglicèrids hepàtics correlacionen negativament amb els nivells plasmàtics de la SHBG i l'expressió hepàtica de la *SHBG* [184,186,187].

L'obesitat és un factor de risc per patir diabetis tipus 2 (DMT2), síndrome metabòlic i CVD, malalties en les quals també s'han observat nivells plasmàtics disminuïts de la SHBG i caracteritzades per una inflamació de baix grau [48].

#### **1.1.6.4.3. Síndrome metabòlic i diabetis tipus 2**

El síndrome metabòlic es caracteritza per resistència a la insulina, obesitat, risc de patir una malaltia cardiovascular, presència d'adipositat abdominal, nivells alts de triglicèrids i glucosa en sang, nivells plasmàtics baixos de lipoproteïna d'alta densitat (HDL) i pressió sanguínia elevada [188]. Molts dels individus que pateixen DMT2 presenten síndrome metabòlic i el 85% d'individus amb DMT2 son obesos [189–191]. LA DMT2 es caracteritza per resistència a la insulina, secreció deficient d'insulina i producció elevada de glucosa hepàtica [192].

Múltiples estudis epidemiològics mostren nivells plasmàtics disminuïts de la SHBG en individus que pateixen el síndrome metabòlic [186,193,194] i DMT2 [195–198]. A més, els individus amb el polimorfisme de nucleòtid únic (SNP) rs6259 al gen de la *SHBG*, els quals presenten nivells disminuïts de la SHBG, tenen un risc més elevat de patir DMT2. En canvi, els individus portadors del SNP rs6259 al gen de la *SHBG*, caracteritzats per presentar nivells elevats de la SHBG plasmàtica, tenen un menor risc de patir DMT2 [198–200].

#### **1.1.6.4.4. Malalties cardiovasculars**

Les malalties cardiovasculars (CVD) comprenen diverses malalties relacionades amb el cor i el sistema circulatori i vascular, incloent l'aterosclerosi i les malalties cerebrovascular, entre moltes altres [201]. La incidència de les

malalties CVD difereix entre sexes, els homes les desenvolupen deu anys abans que les dones [201]. En molts estudis epidemiològics s'ha observat que presentar nivells plasmàtics de la SHBG disminuïts és un factor de risc per desenvolupar una malaltia CVD [202–206], tot i això, no es coneix la implicació de la SHBG en el desenvolupament de la malaltia CVD.

#### **1.1.6.4.5. Esteatosis hepàtica no alcohòlica**

L'esteatosi hepàtica no alcohòlica (NAFLD) representa un conjunt de desordres hepàtics que van de l'esteatosi, marcada per una acumulació de greix al fetge, passant per l'esteatohepatitis no alcohòlica (NASH), on, a més de l'acumulació de grassa, existeix també una inflamació, lesió de les cèl·lules hepàtiques i fibrogènesi, i les quals poden arribar a estadis més severos com la cirrosi i l'HCC [207–210]. El 20% de pacients amb NAFLD acabarà desenvolupant NASH, dels quals, entre un 10-15% progressaran a un fetge cirròtic, fet que augmenta la probabilitat de patir hepatocarcinoma (HCC) [211]. La NAFLD es considera com la manifestació al fetge del síndrome metabòlic i, avui en dia, ha esdevingut un problema a nivell mundial, ja que afecta entre un 14-25% de la població [209].

Diversos estudis mostren nivells plasmàtics disminuïts de la SHBG en pacients que pateixen NAFLD i NASH [212–218]. A més, durant els últims anys, estudis realitzats al nostre laboratori han pogut determinar els mecanismes moleculars involucrats en la regulació hepàtica de la SHBG en l'obesitat i l'esteatosi hepàtica [121], els quals seran explicats en detall més endavant. A més, s'ha observat que la SHBG no és només un biomarcador d'aquestes malalties, sinó que hi juga un paper terapèutic [219–221]. Tot i això, encara no se saben els mecanismes moleculars que regulen la SHBG durant el desenvolupament d'estadis més avançats d'aquesta malaltia, com és la fibrosi hepàtica, i si la SHBG juga algun paper en el seu desenvolupament.

#### 1.1.6.4.6. Síndrome de l'ovari poliquístic

El síndrome de l'ovari poliquístic (PCOS) és el desordre endocrí més comú en dones en edat reproductiva amb una prevalença del 8-13%, el qual es troba en augment [222]. El PCOS es caracteritza per una morfologia d'ovari amb múltiples quistos, una menstruació irregular o amenorrea, signes d'excés d'andrògens i obesitat lleu [223]. Les dones amb PCOS presenten un risc més elevat de patir obesitat, NAFLD, síndrome metabòlic, resistència a la insulina, DMT2 i infertilitat [223,224].

Son diversos els estudis on s'ha observat que la SHBG es troba disminuïda en dones amb PCOS, les quals també presenten nivells augmentats de testosterona [171,222,225,226]. A més, les dones amb PCOS amb nivells plasmàtics més disminuïts de SHBG presenten un major risc metabòlic [227]. A més, diversos polimorfismes de la SHBG han estat relacionats amb el PCOS [228–230], encara que, no se sap si els baixos nivells de la SHBG observats en dones amb PCOS son una causa o un efecte del síndrome o si la SHBG podria jugar un paper en la patogènesis del PCOS [44].

#### 1.1.7. Regulació de la SHBG

Des del desenvolupament del ratolí transgènic per la *SHBG* humana s'han estudiat i detectat diversos factors que regulen l'expressió hepàtica de la SHBG i que, per tant, modulen la seva concentració plasmàtica. Entre ells es troben els factors de transcripció ja esmentats anteriorment, factors genètics, factors hormonals, citocines pro-inflamatòries i antiinflamatòries i factors nutricionals. A la **Figura 10** es troben descrits els mecanismes moleculars pels quals algun d'aquests factors regulen l'expressió hepàtica de la SHBG.

##### 1.1.7.1. Factors genètics

Al gen de la *SHBG* han estat detectats diversos polimorfismes, tant en zones codificants com en zones no codificants, les quals son causants de modular els nivells plasmàtics de la SHBG [27,231,232]. A més, algunes variants de la

SHBG confereixen diferències en l'afinitat de la SHBG pels diferents esteroides sexuals [35].

El primer SNP que es va identificar va ser el polimorfisme rs6259, localitzat a l'exó 8 del gen de la SHBG, el qual provoca una substitució d'amonoàcid a la posició 327 (D327N) [233]. Aquesta substitució afegeix un lloc de *N*-glicosilació a cada monòmer i existeix un retard en l'eliminació de la SHBG del plasma [233] i un augment dels nivells de SHBG i d'esteroides sexuals en plasma [161]. Biològicament, els individus amb aquest SNP presenten un menor risc de patir càncer de mama [234] o DMT2 [198].

Un altre exemple de SNP que modifica els nivells plasmàtics de la SHBG és el rs12150660, situat a 11.5 kb *upstream* de l'inici de la transcripció, el qual està associat a una disminució dels nivells plasmàtics de la SHBG [235]. Existeixen altres SNPs que modifiquen els nivells plasmàtics de la SHBG i que han estat associats a malalties com al PCOS [228–230], a la DMT2 [199,236], al síndrome metabòlic [237,238] o al càncer de mama [239,240].

Al gen de la SHBG també existeix un polimorfisme de repetició de la seqüència (TAAAA)<sub>n</sub> a la regió *alu* del promotor. Entre individus, el número de repeticions d'aquesta seqüència presents al gen de la *SHBG* difereix. Es poden presentar de 6 a 11 repeticions de (TAAAA)<sub>n</sub> [77] i l'activitat transcripcional del promotor de la SHBG i la unió de proteïnes nuclears depèn de la quantitat de repeticions d'aquesta seqüència. Amb la realització d'experiments *in vitro* s'ha descrit que contenir sis repeticions de la seqüència (TAAAA)<sub>6</sub> silencia la transcripció de la SHBG [77] i, a més, dones menopàusiques amb sis repeticions TAAAA<sub>6</sub> presenten una menor producció de SHBG [241]. Tot i això, en altres estudis s'ha descrit que els individus que presenten més repeticions que sis presenten nivells plasmàtics de la SHBG més baixos que els individus amb només sis repeticions [232,242]. S'ha proposat que la diferència observada entre els estudis *in vitro* i els estudis clínics es podria explicar perquè als estudis *in vitro* s'utilitza ADN *naked*, sense considerar la presència d'estructures de cromatina superiors, o que existeixi una contribució d'altres seqüències reguladores [33].



### 1.1.7.2. Factors hormonal

#### 1.1.7.2.1. Esteroides sexuals

En totes les edats, les dones presenten nivells plasmàtics de la SHBG més elevats que els homes (**Taula 1**), aquesta observació ha fet proposar que els esteroides sexuals regulen els nivells de la SHBG.

Pel que fa als estrògens, diversos estudis apunten que el tractament amb estrògens exògens augmenten els nivells plasmàtics de la SHBG en dones [243–246]. Diferents estudis *in vitro*, amb les cèl·lules HepG2, apunten que l'estradiol estimula la producció de la SHBG [247–251] i, a més, s'ha observat una resposta dosi-depenent [137]. El mecanisme molecular no ha estat mai descrit, però al FP3 del promotor de la *SHBG* existeix un lloc d'unió a ER $\alpha$  [48]. La regulació de la SHBG per l'estradiol en dones és controvertit, ja que, durant el cicle menstrual, existeix una fluctuació dels nivells d'estradiol, en canvi, els nivells de la SHBG es mantenen constants al llarg del cicle [252,253]. Per tant, semblaria que l'augment dels nivells d'estradiol durant el cicle menstrual no seria suficientment alt per modular l'expressió hepàtica de la SHBG [252].

En relació als andrògens, es creu que la baixada de la SHBG que s'observa durant l'adolescència en nois és causada pels andrògens, tot i això, no s'ha pogut demostrar que els andrògens regulin la SHBG i no existeix cap element de resposta a andrògens al promotor de la *SHBG* [231].

#### 1.1.7.2.2. Hormones tiroïdals

Els individus amb hipertiroïdisme presenten nivells plasmàtics elevats de la SHBG i en estudis *in vitro* s'observa que el tractament amb hormones tiroïdals augmenten els nivells de la SHBG [181,254]. Selva i Hammond (2009) van demostrar que el tractament amb T3 i T4 durant cinc dies a cèl·lules HepG2 augmentava l'expressió de la SHBG de manera indirecta, augmentant els nivells d'HNF-4 $\alpha$  [105]. Els nivells d'HNF-4 $\alpha$  es veien augmentats per una disminució dels nivells de palmitat i un augment de la lipòlisi [105] (**Figura 10**). A més, el

tractament amb T3 als ratolins transgènics per la *SHBG* humana també augmentava els nivells plasmàtics de la SHBG mitjançant un augment d'HNF-4 $\alpha$  al fetge [105].

### 1.1.7.2.3. Insulina

Durant anys, s'ha cregut que la insulina és la responsable dels baixos nivells plasmàtics de la SHBG observats en individus obesos amb síndrome metabòlic o DMT2, ja que en alguns estudis *in vitro* amb cèl·lules HepG2 es va observar una disminució dels nivells de la SHBG després del tractament amb insulina durant set dies [249,255]. Tot i això, les condicions dels estudis no eren fisiològiques, ja que es van cultivar les cèl·lules HepG2 en medi lliure de sèrum bovi fetal (FBS: *Fetal bovine sèrum*), i en un estudi posterior, amb condicions fisiològiques, es va observar que la insulina no regulava la SHBG [104]. En aquest estudi, Selva *et al.* (2007) van demostrar que, en cèl·lules HepG2 cultivades en medi lliure FBS, condicions no fisiològiques, el tractament amb insulina disminuïa els nivells de la SHBG, en canvi, cultivant les cèl·lules HepG2 en medi amb FBS inactivat o medi amb FBS, condicions més fisiològiques, el tractament amb insulina augmentava lleugerament la SHBG al medi, però no s'observava regulació de l'activitat del promotor de la *SHBG* [104].

Els individus amb obesitat, síndrome metabòlic i DMT2 no només es caracteritzen per presentar hiperinsulinèmia, sinó que també presenten hiperglucèmia i augment de citocines pro-inflamatòries [188], les quals regulen l'expressió hepàtica de la *SHBG* [48].

### 1.1.7.3. Citocines

El desenvolupament de l'obesitat comporta un canvi en la composició del teixit adipós, on, a més de la hipertròfia del teixit deguda a l'acumulació de greix, existeix una infiltració de macròfags activats, els quals produeixen i secreten citocines pro-inflamatòries com la leptina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) i la interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) [256]. A més, el teixit adipós obès disminueix la producció de citocines antiinflamatòries com per exemple l'adiponectina [256].

Els individus que pateixen malalties amb una inflamació de baix grau, com poden ser, l'obesitat, el síndrome metabòlic, la NAFLD o la DMT2, presenten nivells plasmàtics reduïts de la SHBG [48]. Aquestes malalties també es caracteritzen per presentar nivells augmentats de citocines pro-inflamatòries i nivells disminuïts de citocines antiinflamatòries. Els pacients obesos presenten una relació negativa entre els nivells plasmàtics de la SHBG i els nivell del TNF $\alpha$  [107]. Contràriament, diversos estudis mostren una correlació positiva entre els nivells plasmàtics de la SHBG i de l'adiponectina [257–259].

Durant els últims anys, s'han descobert els mecanismes moleculars pels quals les citocines pro-inflamatòries IL-1 $\beta$  i TNF $\alpha$  redueixen els nivells d'expressió hepàtics de la SHBG i els mecanismes moleculars pels quals l'adiponectina, una citocina antiinflamatòria, augmenta l'expressió hepàtica de la SHBG.

#### 1.1.7.3.1. TNF $\alpha$

Mitjançant estudis *in vitro* en cèl·lules HepG2, es va determinar que el tractament amb TNF $\alpha$  disminuïa significativament els nivells de SHBG a partir del tercer dia del tractament mitjançant la inhibició de l'expressió d'HNF-4 $\alpha$  [260]. Concretament, el TNF $\alpha$  s'uneix als seus receptors i activa una cascada de senyalització als hepatòcits que activa el factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades (NF- $\kappa$ B), el qual s'uneix al promotor del gen d'HNF-4 $\alpha$  i en reprimeix l'expressió, conseqüentment, els nivells disminuïts d'HNF-4 $\alpha$  fan disminuir l'expressió hepàtica de la SHBG (Figura 10) [260]. En un altre estudi, aquests resultats van ser corroborats, ja que es va observar que el tractament amb TNF $\alpha$  disminuïa els nivells de SHBG mitjançant una reducció dels nivells del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$  [107].

#### 1.1.7.3.2. IL-1 $\beta$

De la mateixa manera, l'IL-1 $\beta$  inhibeix l'expressió de la SHBG mitjançant la disminució dels nivells d'expressió del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$  [106]. Realitzant estudis *in vitro* amb les cèl·lules HepG2 es va esbrinar el mecanisme molecular: l'IL-1 $\beta$  s'uneix al seu receptor a la membrana dels hepatòcits i activa la

cinasa c-Jun N-terminal (JNK) i la cascada de les la via de les proteïnes cinases activades per mitògens (MAPK), les quals fosforilen i activen a c-Jun, responsable de disminuir els nivells d'expressió del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$ , i, en conseqüència, els nivells de la SHBG [106] (Figura 10). Aquests resultats es van corroborar *in vivo* amb el ratolí transgènic per la SHBG humana on el tractament amb IL-1 $\beta$  durant tres dies augmentava la fosforilació de c-Jun i disminuïa significativament els nivells de la SHBG i els nivells d'expressió del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$  [106].

#### 1.1.7.3.3. Adiponectina

L'adiponectina és una adipoquina antiinflamatòria, de la qual els nivells plasmàtics correlacionen positivament amb els nivells de la SHBG [257–259]. En un estudi amb cèl·lules HepG2 es va determinar que l'adiponectina s'uneix al seu receptor a la membrana dels hepatòcits i activa una cascada de senyalització que augmenta els nivells de la proteïna cinasa activada per AMP (AMPK), la qual disminueix la DNL i augmenta la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos, disminuint el contingut de triglicèrids i augmentant els nivells del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$  (Figura 10) [108], els quals augmenten els nivells d'expressió de la SHBG. En el mateix estudi, amb l'anàlisi de mostres humanes es va observar una correlació positiva entre els nivells plasmàtics d'adiponectina i de la SHBG i els nivells d'expressió hepàtica d'HNF-4 $\alpha$  [108].

#### 1.1.7.4. Factors nutricionals

Diversos estudis mostren que la composició de la dieta influeix en els nivells plasmàtics de la SHBG. En un estudi amb homes ancians que consumien una dieta amb un baix contingut en proteïnes s'observava un augment dels nivells plasmàtics de la SHBG [261]. La dieta Mediterrània també s'ha associat amb nivells plasmàtics de la SHBG augmentats [262]. Pel que fa al contingut en fibra, en alguns estudis s'observa que dietes riques en fibra disminueixen els nivells de la SHBG [263,264]. La disminució del greix a la dieta o el canvi de la precedència d'aquest greix produeix un augment dels nivells plasmàtics de la SHBG [265,266].

A continuació, s'expliquen els mecanismes moleculars pels quals alguns factors nutricionals regulen l'expressió hepàtica de la SHBG.

#### **1.1.7.4.1. Carbohidrats i palmitat**

En el mateix estudi on es va demostrar que la insulina no regulava l'expressió hepàtica de la SHBG, Selva *et al.* (2007) van observar que els monosacàrids (glucosa o fructosa) i el disacàrid sucrosa redueixen la producció hepàtica de la SHBG tant *in vivo* com *in vitro* [104]. En un estudi amb el ratolí transgènic per la *SHBG* humana es va veure que el consum d'una dieta rica en sacarosa, fructosa o glucosa reduïa els nivells plasmàtics de la SHBG, si es comparava amb els nivells dels animals que havien consumit una dieta control [104]. Aquests resultats es van corroborar *in vitro*, es van tractar, durant cinc dies, a cèl·lules HepG2 amb fructosa o glucosa i es va veure que el tractament disminuïa l'expressió de la SHBG [104]. Concretament, el tractament amb monosacàrids disminuïa els nivells del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$ , fet que permet la unió del factor de transcripció COUP-TF al FP1 i es reprimeix la transcripció del gen de la *SHBG* (Figura 10) [104].

Al mateix estudi es va observar que el tractament amb fructosa o glucosa augmentava els nivells de palmitat a les cèl·lules HepG3. A més, la disminució de l'expressió de SHBG i d'HNF-4 $\alpha$  pel tractament amb glucosa o fructosa es podia bloquejar amb la cerulina, la qual inhibeix la DNL [104]. Finalment, es va observar que el tractament durant tres dies a cèl·lules HepG2 amb palmitat disminuïa els nivells d'HNF-4 $\alpha$  i els nivells de SHBG (Figura 10) [104].

#### **1.1.7.4.2. Oli d'oliva**

L'oli d'oliva és la font primària de greixos de la dieta Mediterrània, la qual s'ha relacionat amb nivells elevats de la SHBG en plasma [262] i amb un risc disminuït de patir obesitat, síndrome metabòlic, DMT2 i CVD [267]. L'oli d'oliva és un aliment amb un alt contingut en àcids grassos monoinsaturats (MUFAs: *Monounsaturated fatty acids*) i polifenols [268].

Un estudi va analitzar l'efecte, en homes, de consumir durant sis anys oli d'oliva. Els resultats es van comparar amb un altre grup d'homes que van consumir altres tipus d'olis rics en àcid linoleic. Els nivells plasmàtics de la SHBG es trobaven significativament augmentats al grup d'homes que van consumir oli d'oliva, si es comparaven amb els nivells plasmàtic de SHBG dels homes que van consumir altres olis [269]. En aquest estudi es va observar una correlació positiva entre els nivells plasmàtics de la SHBG i el percentatge de MUFAs i una correlació negativa entre el percentatge d'àcids grassos poliinsaturats (PUFAs: *Polyunsaturated fatty acids*) i la SHBG [269].

per tal de determinar el mecanisme molecular pel qual l'oli d'oliva regulava l'expressió hepàtica de la SHBG, es van realitzar estudis *in vitro* amb cèl·lules HepG2. Es van tractar a cèl·lules HepG2 amb oleil-CoA, ja que l'àcid oleic és el MUFA majoritari de l'oli d'oliva [270], i es va comparar amb el tractament amb linoleil-CoA i amb vehicle. El tractament amb oleil-CoA augmentava els nivells de la SHBG, els quals no es veien modificats pel tractament amb linoleil-CoA. A més, es va determinar que l'augment de la SHBG es produïa per una baixada dels nivells del factor de transcripció PPAR $\gamma$  (Figura 10) [269].

#### 1.1.7.4.3. Compostos polifenòlics del vi negre: el resveratrol

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxitransetilbè) (RSV) és un membre de la família dels estilbens dels compostos dels polifenols, el qual es troba al raïm, als cacauets i en algunes baies [271,272]. El raïm conté *trans*-resveratrol a la pell, per aquesta raó, el vi negre conté de 5 a 20 vegades més RSV que el vi blanc, on es detecta menys de 0.1 mg/ml de RSV [273].

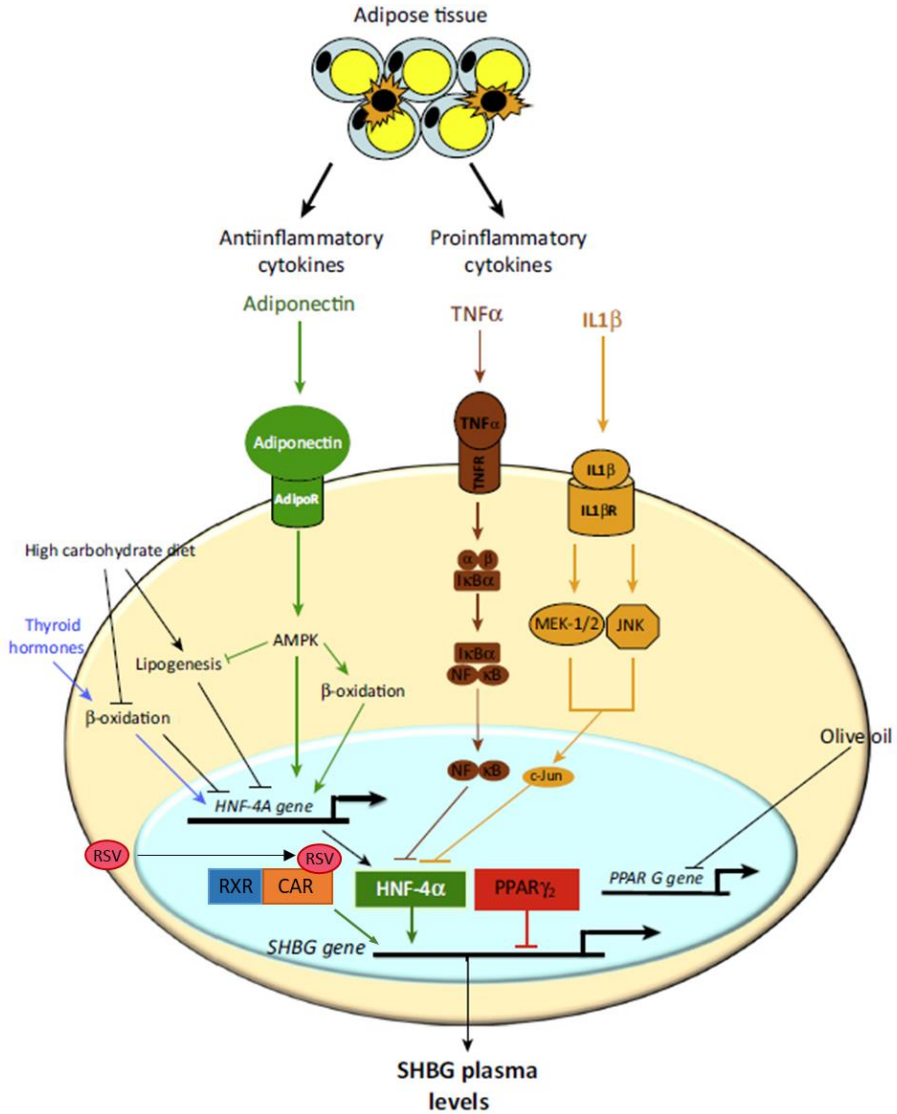
El RSV és un antioxidant considerat un agent protector contra el desenvolupament de malalties CVD, càncer o de les conseqüències de dietes riques en greix [274–279]. En un estudi previ realitzat al nostre laboratori, mitjançant experiments *in vitro* amb les cèl·lules HepG2, es va observar que el vi negre augmentava significativament els nivells de la SHBG, en canvi, el tractament amb la mateixa quantitat de vi blanc no modificava els nivells de la

SHBG [75]. Ja que al vi negre hi ha més quantitat de *trans*-resveratrol que al vi blanc, van tractar les cèl·lules HepG2 amb RSV i van observar que el tractament augmentava els nivells de la SHBG. Concretament, el RSV s'uneix al CAR humà i l'activa. Un cop activat el CAR forma un dímer amb RXR i s'uneix a l'element DR1, situat a 70 pb del promotor proximal del gen de la *SHBG*, i activa l'expressió de la SHBG (Figura 10) [75]. A més, al mateix estudi, van demostrar que el RSV només activa el CAR humà específicament, i que no afecta al Car de ratolí. Van tractar amb RSV a ratolins transgènics per la *SHBG* humana i no van observar modificació de l'expressió hepàtica de la SHBG. En canvi, si que s'observava un augment dels nivells plasmàtics de la SHBG, després del tractament amb RSV, en animals doble transgènics (per la *SHBG* humana i el CAR humà) [75]. Finalment, també es va observar una correlació positiva entre els nivells d'expressió de *CAR* i de *SHBG* en biòpsies hepàtiques [75].

#### 1.1.7.4.4. Productes amb cafeïna

La cafeïna és l'agent psicoactiu més consumit mundialment, es troba en moltes plantes i el cafè és la beguda amb cafeïna més consumida en adults [280]. El cafè, a part de la cafeïna, conté altres fitoquímics com per exemple, polifenols com l'àcid clorogènic, lignans, magnesi, potassi i niacina [281].

El consum de cafè s'ha relacionat amb un menor risc de patir DMT2 [282–284]. A més, diversos estudis correlacionen positivament el consum de cafè o altres productes amb cafeïna amb els nivells plasmàtics de la SHBG [285–292]. Alguns estudis apunten que, en consumidors de cafè, l'augment dels nivells plasmàtics de la SHBG són els responsables del menor risc de patir DMT2 [286,292]. Tot i això, encara no s'ha descrit el mecanisme molecular pel qual la cafeïna augmenta els nivells plasmàtics de la SHBG.



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

**Figura 10:** Mecanismes moleculars que regulen l'expressió hepàtica de la SHBG.

Les citocines pro-inflamatòries TNF $\alpha$  i IL1 $\beta$  disminueixen els nivells d'HNF-4 $\alpha$  per diversos mecanismes moleculars, disminuint l'expressió hepàtica de la SHBG. En canvi, l'adiponectina augmenta els nivells de la SHBG augmentant l'expressió d'HNF-4 $\alpha$ , inhibint la DNL i augmentant la  $\beta$ -oxidació. Factors nutricionals com la dieta rica en greix, augmenta la DNL i disminueix la  $\beta$ -oxidació, fet que fa disminuir l'expressió d'HNF-4 $\alpha$  i, en conseqüència, la SHBG. En canvi, l'oli d'oliva disminueix l'expressió de PPAR $\gamma$ , fet que fa augmentar l'expressió de la SHBG. Les hormones tiroïdals augmenten els nivells de la SHBG mitjançant un augment d'HNF4 $\alpha$ . Finalment, el resveratrol (RSV) s'uneix al CAR, el qual dimeritza amb RXR i s'uneix al DR1 del promotor de la SHBG, augmentant els nivells de la SHBG en humans. Figura modificada de: Simó R, et al. Trends Endocrinol Metab. 2015 Jul;26(7):376-83.



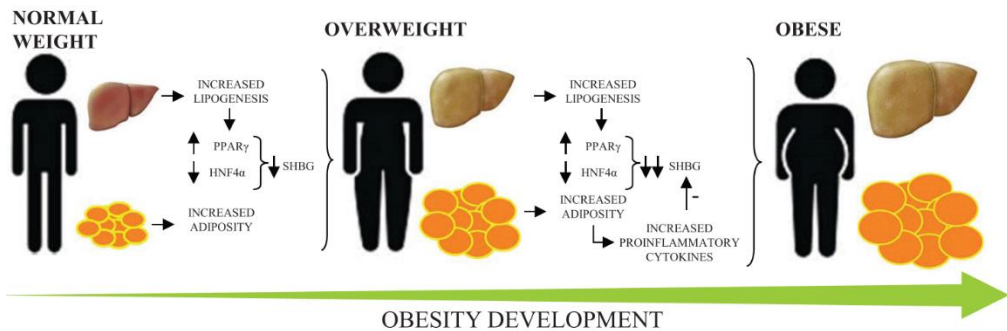
### 1.1.7.5. Regulació de la SHBG en el desenvolupament de malalties humanes: obesitat i NAFLD

Els nivells plasmàtics de la SHBG es troben disminuïts en diverses malalties metabòliques com l'obesitat, la DMT2, el síndrome metabòlic o la NAFLD. El fet que els ratolins no expressin la SHBG al fetge, com els humans, ha dificultat l'estudi de la regulació de la SHBG durant el desenvolupament d'aquestes malalties. Per aquest motiu, en un estudi previ realitzat al nostre laboratori Saéz-López, *et al.* (2015) van generar un model animal per estudiar la regulació de la SHBG durant el desenvolupament de l'obesitat, creuant animals de la soca C57BL/ksJ-db/db, d'aquí en endavant db/db, amb els ratolins transgènics per la *SHBG* humana i generant ratolins db/db els quals expressaven la SHBG al fetge [121].

Els ratolins db/db presenten una mutació al gen del receptor de la leptina, el qual perd la seva funció, i provoca el desenvolupament de resistència a la leptina i, per tant, una falta de control sobre la sacietat [293]. A les quatre setmanes, aquests animals desenvolupen una obesitat severa, acompanyada de hiperglucèmia, de hiperinsulinèmia, de DMT2 i d'acumulació de greix al fetge [294].

La sobreexpressió de la SHBG als ratolins db/db produeix una disminució del pes total respecte als ratolins db/db, tot i això, no s'observen diferències al seu perfil metabòlic en sang. Els ratolins SHBG-db/db acumulen triglicèrids al fetge [121], una característica dels pacients obesos amb NAFLD [184], la qual és una de les malalties metabòliques en les que s'ha observat una disminució dels nivells plasmàtics de la SHBG. En aquest estudi es va observar una disminució dels nivells plasmàtics de la SHBG als ratolins SHBG-db/db, comparats amb els ratolins SHBG-db/+ [121], confirmant el que s'ha reportat durant el desenvolupament de l'obesitat i la NAFLD en humans [213,216,218]. La disminució de la SHBG es produeix per una reducció dels nivells del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$  i un augment dels nivells de PPAR $\gamma$ , el qual ocupa el lloc d'unió al FP3, desplaçant la unió d'HNF-4 $\alpha$  i, en conseqüència, es disminueix

l'expressió de la SHBG [121]. Aquests resultats es van confirmar amb biòpsies hepàtiques humanes de pacients obesos on es va observar una correlació positiva entre els nivells d'expressió de SHBG i HNF-4 $\alpha$  i una correlació negativa entre els nivells d'expressió de SHBG i de PPAR $\gamma$  (Figura 11) [121].



**Figura 11:** Mecanismes moleculars que regulen l'expressió de la SHBG durant el desenvolupament de l'obesitat i la NAFLD. L'increment de la DNL i l'acumulació de triglicèrids hepàtics durant el desenvolupament de l'obesitat i la NAFLD fan augmentar els nivells del factor de transcripció PPAR $\gamma$  i disminueixen els nivells del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$ , fet que fa disminuir els nivells d'expressió hepàtica de la SHBG. Figura extreta de: Saéz-López, C, *et al.* *Endocrinology*. 2015 Dec;156(12):4571-81

### 1.1.8. Implicacions terapèutiques de la SHBG en malalties humanes: obesitat i NAFLD

En els últims anys, s'ha vist que la SHBG no és només un biomarcador de malalties com l'obesitat o la NAFLD, sinó que el fet de presentar nivells disminuïts de la SHBG contribueix a la progressió d'aquestes malalties [219,220].

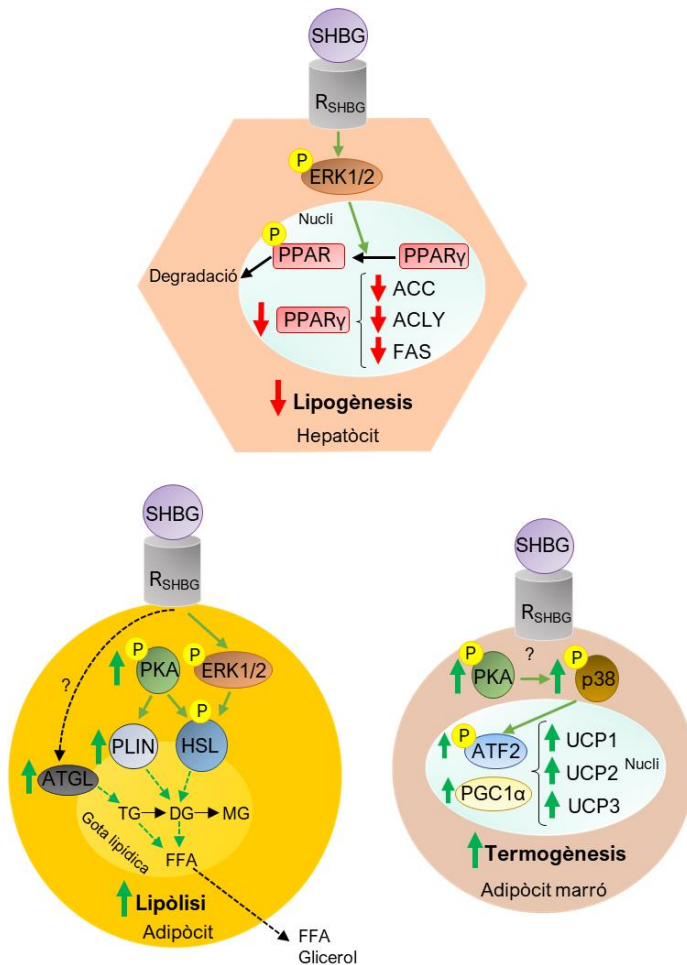
Sáez-López, *et al.* (2017) van estudiar el paper de la SHBG en el desenvolupament de la NAFLD, per això van utilitzar els ratolins transgènics per la SHBG humana i van generar dos models animals de NAFLD: el model db/db i un model de NAFLD induïda per una dieta rica en fructosa. Als dos models de NAFLD generats, es va observar que la sobreexpressió de la SHBG disminuïa l'acumulació de triglicèrids hepàtics, mitjançant la reducció dels nivells d'expressió d'enzims claus de la DNL: ACC1, FAS i ATP citrat sintasa (ACLY) [219]. A més, realitzant estudis *in vitro* amb les cèl·lules HepG2, van demostrar que la sobreexpressió de la SHBG reduïa l'expressió d'aquests enzims, mitjançant

l'activació de pERK1/2, el qual fosforilava a PPAR $\gamma$  i l'inactivava, reduint els nivells de PPAR $\gamma$  totals [219]. Corroborant aquests resultats, en un altre estudi amb mostres hepàtiques humanes, es va observar que la SHBG estava disminuïda en pacients amb síndrome metabòlic i que els nivells d'ARNm i de proteïna de la SHBG correlacionaven negativament amb els nivells d'expressió d'ARNm d'ACC i amb el contingut de triglicèrids hepàtics [187].

Sáez-López, *et al.* (2020) també van estudiar les implicacions de la SHBG en el desenvolupament de l'obesitat en un model animal d'obesitat induïda per una dieta rica en greix [220]. Es van utilitzar ratolins WT i ratolins transgènics per la *SHBG* humana i es va observar que la sobreexpressió de la SHBG protegeix del guany de pes total i de l'acumulació de greix al teixit adipós induïts per una dieta rica en greix [220]. A més, els ratolins transgènics per la *SHBG* humana alimentats amb una dieta rica en greix mostren una millora del perfil metabòlic, ja que presenten nivells d'insulina, resistina, leptina i adiponectina similars als que s'observen als animals alimentats amb una dieta control i, a més, responen millor als testos de tolerància a la glucosa i a la insulina que els animals WT alimentats amb una dieta rica en greix [220]. En aquest estudi es va poder determinar que la SHBG indueix un increment en l'expressió de gens involucrats en la lipòlisi, com son la perilipina-1 (PLIN), la lipasa hormona-sensible (HSL), ERK1/2 i la proteïna cinasa A (PKA) (Figura 12) [220].

Aquests resultats es van confirmar realitzant un assaig de lipòlisi *in vivo*, injectant intraperitonealment SHBG a ratolins WT. El tractament amb SHBG incrementava la concentració d'àcids grassos lliures a la sang, és a dir, la SHBG augmentava la lipòlisi al teixit adipós, mitjançant un increment de la fosforilació d'ERK1/2 i d'HSL (Figura 12) [220]. Aquests resultats es van corroborar *in vitro* amb adipòcits madurs humans, els quals van ser tractats amb SHBG i es va observar una inducció de la lipòlisi mitjançant la fosforilació d'ERK1/2 i d'HSL [220].

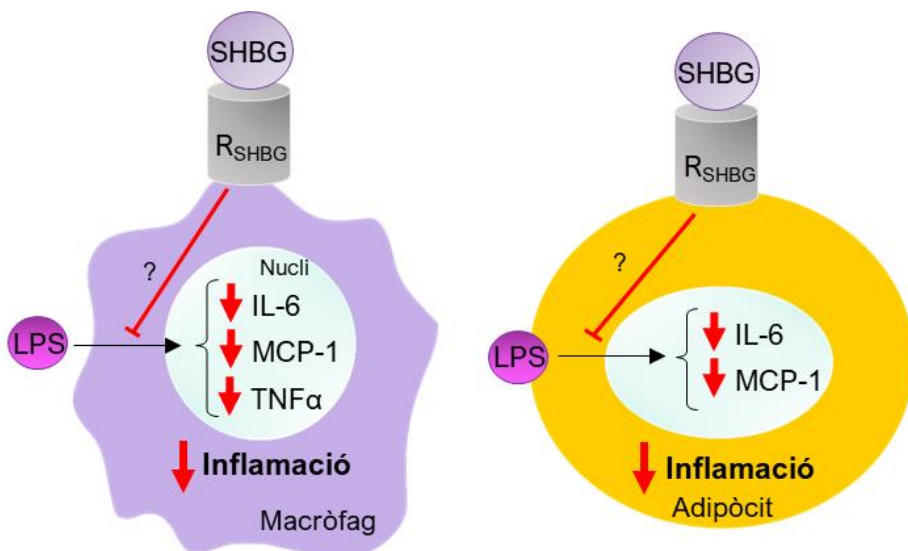
Al mateix estudi es va analitzar el teixit adipós marró i es va observar que els ratolins transgènics per la *SHBG* humana alimentats amb dieta rica en greix presentaven un augment de les proteïnes desacobladores 1, 2 i 3 (UCP1, UCP2 i UCP3) [220], implicades en l'activitat termogènica del teixit adipós marró [295], respecte als animals WT. Aquest augment estava mediat per un increment de PGC1 $\alpha$  i una inducció de la fosforilació d'ATF-2, p38 i PKA, vies de senyalització implicades en la regulació de les UCPs (Figura 12) [296].



**Figura 12:** Implicacions terapèutiques de la SHBG en l'esteatosi hepàtica i l'obesitat.

Als hepatòcits, la SHBG disminueix la lipogènesi disminuint enzims claus d'aquesta via com l'ACC, l'ACLY i la FAS. Als adipòcits, la SHBG incrementa la lipòlisi, augmentant la fosforilació d'HSL i els nivells de PLIN i ATGL. Als adipòcits marrons, la SHBG incrementa la termogènesi augmentant els nivells de les UCPs, mitjançant un increment de la fosforilació de PKA, p38 i ATF2 i augmentant els nivells de PGC1 $\alpha$ .

En un altre estudi *in vitro* realitzat per Yamazaki, *et al.* (2018) es va confirmar que el tractament amb SHBG a cèl·lules 3T3-L1, adipòcits de ratolí diferenciats, augmentava la lipòlisi augmentant els nivells d'expressió de la lipasa de triglicèrids del teixit adipós (ATGL) (Figura 12) [221]. També es va observar un augment d'UCP2 i una disminució de gens implicats en la lipogènesis, com PPAR $\gamma$  [221]. Al el mateix estudi, es va determinar l'efecte antiinflamatori de la SHBG, el tractament amb SHBG, tant en macròfags murins, com en adipòcits de ratolí 3T3-L1, era capaç de bloquejar l'efecte inflamatori del lipopolisacàrid (LPS), ja que el tractament amb SHBG feia disminuir els nivells d'expressió de citocines pro-inflamatòries com per exemple el TNF $\alpha$ , la interleuquina 6 (IL-6) i la proteïna quimioatracent de monòcits 1 (MCP-1) o també anomenada quimiocina amb motiu C-C lligand 2 (CCL2: *Chemokine (C-C motif) ligand 2*) (Figura 13) [221].



**Figura 13:** Implicacions terapèutiques de la SHBG en la inflamació. Als macròfags, la SHBG bloqueja la inflamació induïda per LPS, disminuint els nivells d'IL-6, TNF $\alpha$  i MCP-1. De la mateixa manera, la SHBG inhibeix la inflamació induïda per LPS als adipòcits, disminuint l'expressió d'IL-6 i MCP-1.

En un estudi recent s'ha vist que la SHBG disminueix l'estrès del reticle endoplasmàtic induït pel palmitat, tant *in vitro* com *ex vivo*, disminuint els nivells de l'enzim 1  $\alpha$  que requereix la inositol / treonina proteïna cinasa (IRE1 $\alpha$ : *Inositol-Requiring Enzyme 1 alpha*) mitjançant l'activació del factor de transcripció activador 6 (ATF6: *Activating Transcription Factor 6*), el transcrit induïble per dany a l'ADN 3, també anomenada proteïna homòloga a C/EBP (CHOP: *C/EBP Homologous Protein*) i la proteïna lligadora de immunoglobulines (BIP: *Binding Immunoglobulines Protein*) [297]. L'estrès del reticle endoplasmàtic és un punt crític durant el desenvolupament de la NAFLD, que més endavant s'explicarà en més detall.

Els baixos nivells de la SHBG que caracteritzen les malalties metabòliques com l'obesitat, el síndrome metabòlic o la NAFLD, a més de ser un biomarcador, també juguen un paper important en el desenvolupament d'aquestes malalties. S'ha demostrat que la SHBG inhibeix l'expressió d'enzims claus de la lipogènesis, augmenta la lipòlisi, té un efecte antiinflamatori i disminueix l'estrès del reticle endoplasmàtic (Figura 12 i Figura 13) [219–221,297]. L'acumulació de greix, la inflamació, l'estrès del reticle endoplasmàtic i la fibrosis són punts claus del desenvolupament de la NAFLD [207], l'estudi de factors que regulen la SHBG és important per tal de poder realitzar aproximacions dietètiques o farmacològiques que augmentin els nivells plasmàtics de la SHBG en aquestes patologies, on els nivells plasmàtics de la SHBG es troben disminuïts.

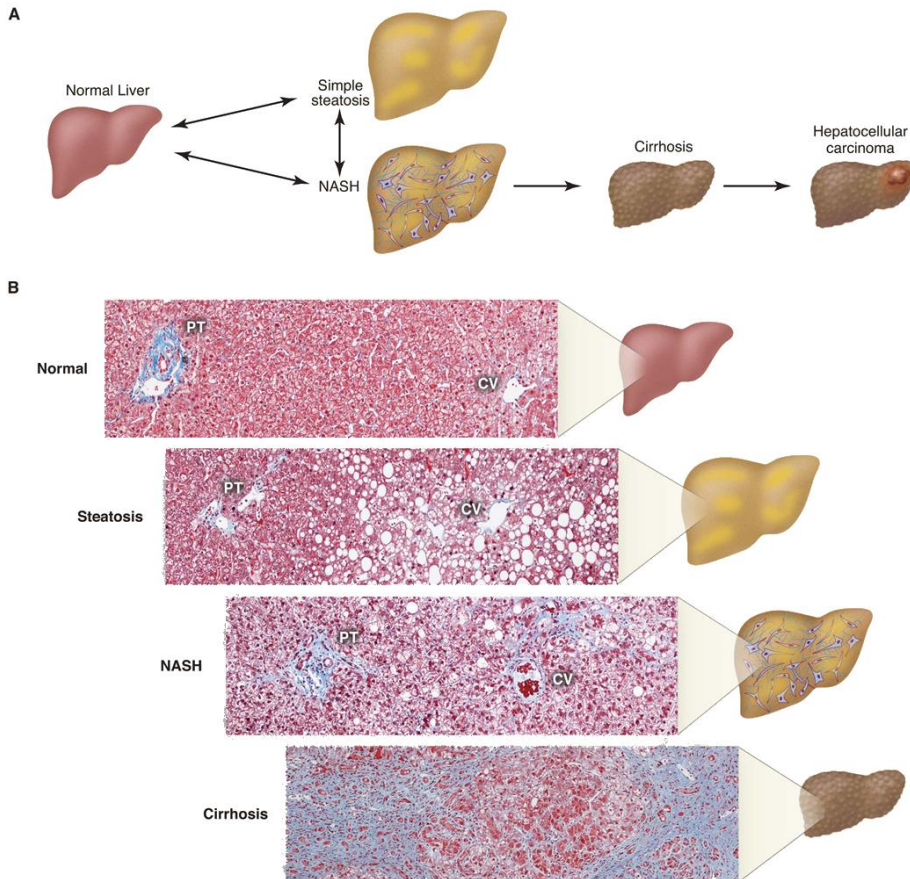
## 1.2. Malaltia del fetge gras no alcohòlic (NAFLD)

La malaltia del fetge gras no alcohòlica (NAFLD) representa un conjunt de desordres hepàtics o estadis que comprenen des de l'esteatosi hepàtica, l'esteatohepatitis (NASH) amb o sense fibrosi, la cirrosi i l'HCC (**Figura 14**), les quals no son causa de cap etiologia hepàtica coneguda com el consum excessiu d'alcohol, hepatitis víriques o ús de medicaments, entre altres [298].

La NAFLD és la malaltia hepàtica més freqüent als països desenvolupats, s'ha estimat que entre un 14-25% de la població general la pateix [209]. La seva prevalença ha anat incrementant-se durant els últims anys, en paral·lel a l'augment d'algunes malalties associades com l'obesitat, la resistència a la insulina, el síndrome metabòlic o la DMT2 [299]. La prevalença de la NAFLD en persones obeses és del 60-75% i aquesta sembla estar associada amb la resistència a la insulina [300]. De fet, el 90% de pacients amb DMT2 presenten NAFLD [301]. De la mateixa manera, s'ha estimat que entre un 3-12% de la població pediàtrica pateixen NAFLD, però la prevalença de la NAFLD puja fins al 70-80% en infants obesos [302].

Els individus amb NAFLD tenen un major risc de patir DMT2 [303], malalties CVD [304] i és el factor de risc més important per patir HCC [305]. En un estudi es van seguir a individus amb NAFLD durant trenta-tres anys i es va observar que els pacients amb NAFLD presentaven una taxa de mortalitat més elevada, deguda a un increment del risc cardiovascular, de patir HCC o de cirrosi i la presència de fibrosi era el factor clau per un mal pronòstic [306]. Degut a l'augment de la prevalença de la NAFLD i els riscos associats que comporta, l'estudi de biomarcadors que puguin predir el desenvolupament de la NAFLD o d'estratègies terapèutiques per atacar la malaltia en els diferents estadis ha esdevingut de gran importància durant els últims anys [307].

Com es pot observar a la **Figura 14**, el primer estadi de la NAFLD és l'esteatosi simple, és a dir, l'acumulació de greix al fetge. Un 10-25% dels individus que pateixen esteatosi progressen a NASH, on, a més d'esteatosi, hi ha lesió cel·lular i inflamació, d'aquests, el 38-50% desenvolupen fibrosi [308], el 15% cirrosi i el 3% acaben progressant a HCC [309].



**Figura 14:** Desenvolupament de la NAFLD. El primer estadi de la NAFLD és l'esteatosi simple, la qual pot progressar a NASH, on hi ha lesió cel·lular, inflamació i fibrosi. La malaltia pot evolucionar a estadij més severj com la cirrosi o l'hepatocarcinoma (HCC). Figura modificada de: *Cohen, JC. et al. Science. 2011 Jun 24;332(6037):1519-23.*



### 1.2.1. Diagnòstic de la NAFLD

Existeixen diferents proves per diagnosticar la NAFLD, com poden ser, els testos en sang dels enzims hepàtics d'alanina aminotransferasa (ALT) o l'aspartat aminotransferasa (AST), els quals es troben augmentats en pacients amb NAFLD [310], o proves d'imatge que s'han desenvolupat durant els últims anys com l'elastografia, que mesura la rigidesa del fetge i determina l'estadi de la fibrosi [311]. Tot i això, la biòpsia hepàtica segueix sent la prova diagnòstica de referència, ja que pot discernir entre la NAFLD i la NASH. La biòpsia hepàtica es realitza a pacients amb resistència a la insulina i que presenten nivells augmentats d'ALT i d'AST.

Amb la biòpsia hepàtica, mitjançant una classificació histològica, s'avaluen l'esteatosi, els estadis de la NASH i la fibrosi hepàtica present. El primer sistema de classificació histològica va ser proposat per Brunt *et al.* (1999), en el qual la classificació es basava en les característiques de la progressió i evolució dels diferents estadis de la malaltia i de la fibrosi [312]. Tot i això, el sistema més àmpliament utilitzat actualment és el sistema NASH-CRN, publicat l'any 2005 pel NASH Clinical Research Network [313].

El sistema NASH-CRN és un mètode validat, creat per nou patòlegs a cegues, que es pot aplicar durant tot el desenvolupament de la NAFLD, tant l'adultia com la pediàtrica, i que genera una puntuació numèrica, la puntuació NAS (*NAFLD Activity Score*), la qual s'utilitza per comparar les biòpsies durant els assajos clínics de pre- i post-tractaments i en la recerca, però que no és utilitzada pel diagnòstic [314,315]. La puntuació NAS és la suma de les puntuacions d'esteatosi, inflamació i balonització dels hepatòcits, avaluades pel sistema NASH-CRN, les quals es poden observar a la **Taula 2** [313]. La balonització dels hepatòcits es dona quan els hepatòcits estan morint, els quals dupliquen o tripliquen la mida dels hepatòcits sans i contenen el nucli degradat al centre de la cèl·lula.

La puntuació NAS pot oscil·lar entre 0-8 punts, una puntuació entre 0-2 es considera no presentar NASH, entre 3-4 son casos intermedis que no es poden

classificar entre no NASH o NASH i entre 5-8 punts correlaciona amb un diagnòstic de NASH. El sistema de puntuació de la fibrosi duta a terme pel sistema NASH-CRN és molt semblant al proposat per Brunt *et al.* (1999), però subdivideix l'estadi 1 en tres sub-grups. A la **Taula 2** es pot veure el sistema de puntuació de NASH-CRN.

**Taula 2:** Sistema NASH-CRN. Sistema de puntuació que classifica la progressió de la malaltia NAFLD-NASH. <sup>1</sup> Número de focus d'inflamació per camp de magnitud X200.

<b>Esteatosis</b>	<b>Inflamació<sup>1</sup></b>	<b>Balonització dels hepatòcits</b>	<b>Estadi de la fibrosi</b>
<b>0</b> < 5%	<b>0</b> Cap	<b>0</b> Cap	<b>0</b> No hi ha presència de fibrosi
<b>1</b> 5-33%	<b>1</b> < 2	<b>1</b> Alguns hepatòcits amb balonització	<b>1a</b> Fibrosi perisinusoidal lleu
<b>2</b> 34-66%	<b>2</b> 2-4	<b>2</b> Molts hepatòcits amb balonització	<b>1b</b> Fibrosi perisinusoidal moderada
<b>3</b> > 66%	<b>3</b> >		<b>1c</b> Fibrosi portal / periportal
			<b>2</b> Fibrosi perisinusoidal i portal / periportal amb formació de ponts
			<b>3</b> Cirrosi establerta

## 1.2.2. Progressió de la NAFLD

### 1.2.2.1. Esteatosis hepàtica

El primer estadi de la NAFLD és l'esteatosi hepàtica, és a dir, l'acumulació de triglicèrids en vacuoles lipídiques al citoplasma dels hepatòcits, els quals han d'excedir el 5% del pes total del fetge [316]. Aquest estadi s'origina per un desequilibri entre els mecanismes de síntesi, captació, transport i eliminació de triglicèrids al fetge.

Els àcids grassos arriben al fetge per tres mecanismes, el primer és la captació dels àcids grassos de la sang que procedeixen de la lipòlisi duta a terme al teixit adipós. En un estudi amb isòtops marcats es va demostrar que el 59% dels triglicèrids acumulats al fetge provenien dels àcids grassos lliures de la sang [317]. La insulina regula la lipòlisi al teixit adipós, quan existeix resistència a la insulina o inflamació del teixit adipós, processos observats en individus obesos,

es desregula la lipòlisi, resultant en un lliurament excessiu d'àcids grassos al torrent sanguini, que arriben al fetge [318]. La segona font d'àcids grassos del fetge és a partir de la DNL utilitzant la glucosa i la fructosa com a substrat [317]. Un excés en la ingesta de carbohidrats esdevé en un increment de la DNL al fetge. La introducció de la glucosa a la via de la DNL està altament regulada, en canvi, tota la fructosa captada de la sang és fosforilada i introduïda a la via de la DNL [307]. La dieta és la tercera font d'àcids grassos al fetge, un augment en la ingesta dels greixos a la dieta comporta l'acumulació d'aquests en forma de triglicèrids al fetge. Quan al fetge hi ha un excés d'àcids grassos lliures, aquests s'esterifiquen per formar triglicèrids i s'emmagatzemen en gotes lipídiques [319]. També s'ha observat una predisposició genètica a acumular triglicèrids al fetge i a patir NAFLD, per exemple, ser portador del SNP rs738409 de la proteïna amb el domini de la fosfolipasa tipus patatina 3 (PNPLA3: *Patatin-Like Phospholipase domain-containing protein*) és un potent factor que predisposa a patir fetge gras [319].

L'acumulació de triglicèrids hepàtics és suficient per activar diferents vies de senyalització com la de JNK o la del NF- $\kappa$ B, les quals generen resistència a la insulina [320,321], és a dir, que la resistència a la insulina i la progressió de la NAFLD són processos que es retroalimenten en un cercle viciós [322].

En la majoria de casos, la NAFLD es limita a aquest estadi i, durant anys, ha estat considerada una condició benigna [323], però el 20% de pacients que pateixen esteatosis hepàtica progressen a NASH, on, a més d'esteatosi hepàtica, es troba presència d'infiltrat inflamatori i lesió dels hepatòcits, que es manifesta en balonització i mort cel·lular [324] i que pot progressar a cirrosi i a HCC, incrementant la mortalitat [309].

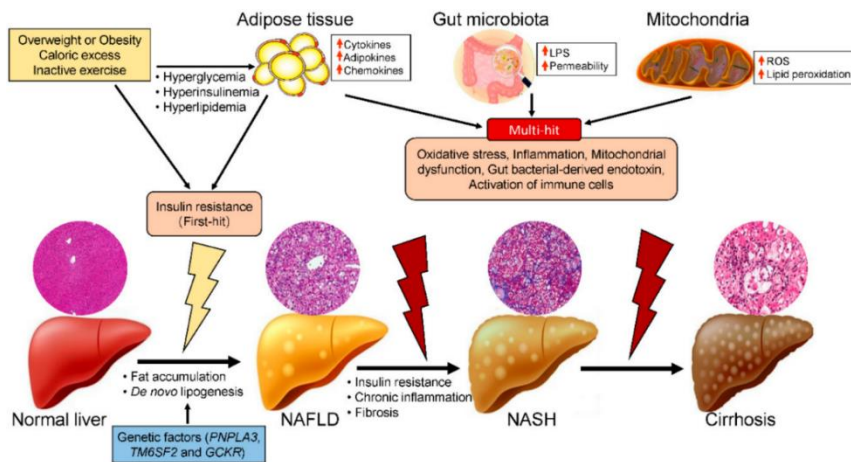
### 1.2.2.2. NASH

El mecanisme pel qual la malaltia progressa és complex i s'han formulat diferents teories al respecte. Inicialment es va formular la teoria dels "dos impactes": el primer impacte és l'acumulació de triglicèrids hepàtics, els quals sensibilitzen el fetge pel segon impacte, que activa la cascada inflamatòria, la mort cel·lular i la fibrosi [325]. Aquesta teoria és massa simplista i actualment està

àmpliament acceptada la teoria dels “impactes paral·lels múltiples”, on es considera que son diversos els factors implicats en la progressió de la NAFLD / NASH, els quals succeeixen en paral·lel.

### 1.2.2.2.1. Factors implicats en la progressió de la NAFLD / NASH

La teoria dels “impactes paral·lels múltiples” considera que diferents factors, que ocorren en paral·lel, com l'estrès oxidatiu, la lipotoxicitat, l'estrès del reticle endoplasmàtic, la resistència a la insulina, la inflamació del teixit adipós, endotoxines provinents de la microbiota intestinal, entre altres, son els causants de la inflamació crònica hepàtica característica de la NASH [301,324,326] (Figura 15).



**Figura 15:** Factors implicats en la progressió de la NAFLD / NASH. Diversos factors genètics, la resistència a la insulina, entre altres, augmenten l'acumulació de triglicèrids als hepatòcits causant esteatosi hepàtica. Altres factors, com la disfunció mitocondrial, l'augment de secreció de citocines proinflamatòries o les endotoxines provinents de l'intestí, provoquen l'activació de les cèl·lules de Kupffer i la infiltració d'altres cèl·lules immunitàries generant inflamació, mort cel·lular i, en alguns casos, fibrosi, característiques de la NASH, la qual pot progressar a cirrosi i en últim terme a hepatocarcinoma (HCC). Figura extreta de: Xu, L. et al. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec;20(23): 5920.

#### 1.2.2.2.1.1 Estrès oxidatiu i lipotoxicitat

Els àcids grassos lliures, els triglicèrids i altres metabòlits com els diacilglicerols, les ceramides o les acilcarnitines en excés provoquen lipotoxicitat i son perjudicials pels hepatòcits [319]. L'excés d'àcids grassos lliures al fetge satura la via de la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos als mitocondris, produint una disfunció mitocondrial, generant espècies reactives d'oxigen (ROS: *Reactive oxygen species*) i, finalment, estrès oxidatiu. A més, també s'activen les vies de la  $\beta$ -oxidació als peroxisomes i la  $\omega$ -oxidació als microsomes, generant encara més ROS i agreujant l'estrès oxidatiu [326–328]. Les ROS tenen una vida mitja curta, però poden peroxidar PUFAs i formar compostos aldehids com el *trans*-4-hidroxi-2-nonenal o la malondialdehid, els quals difonen a altres espais i amplifiquen els efectes de l'estrès oxidatiu [320]. L'estrès oxidatiu activa vies inflamatòries i apoptòtiques als hepatòcits, els quals alliberen molècules amb patrons moleculars associats a danys (DAMP: *Damage-associated molecular patterns*) que activen als macròfags residents del fetge [329,330].

#### 1.2.2.2.1.2 Estrès del reticle endoplasmàtic

La menor producció d'energia per part dels mitocondris, deguda a l'estrès oxidatiu, condueix a un augment de l'estrès del reticle endoplasmàtic [331]. El reticle endoplasmàtic és un orgànul que participa en la síntesi, el plegament i la mobilitat de les proteïnes dins la cèl·lula. Una disfunció del reticle endoplasmàtic fa que s'activi una resposta a l'acumulació de proteïnes mal plegades i augmenta l'expressió de cinases i gens proapoptòtics, induint mort cel·lular als hepatòcits, els quals alliberen DAMPs [330,332].

#### 1.2.2.2.1.3 Microbiota intestinal

Un altre factor important en la progressió de la NAFLD és la microbiota intestinal, la qual pot afectar al metabolisme dels lípids [333]. La disbiosi és l'alteració de la composició de la microbiota intestinal, que pot estar provocada per una resposta a modificacions a la dieta, per trastorns de la motilitat gastrointestinal, per medicaments o per altres factors ambientals [334]. S'ha

observat que pacients amb una adipositat augmentada presenten menys riquesa de la microbiota [335]. A més, l'augment de la permeabilitat de la barrera epitelial promou la translocació de patrons associats a patògens (PAMPs) o endotoxines com el LPS a la circulació, augmentant la resposta inflamatòria al fetge (Figura 15) [336].

#### 1.2.2.2.1.4 Citocines proinflamatòries

La resistència a la insulina promou una disfunció al teixit adipós i una alteració de la producció i secreció de citocines proinflamatòries, com per exemple de TNF- $\alpha$  i d'IL-6 i una disminució en la producció d'adipoquines antiinflamatòries com per exemple l'adiponectina [319]. A més, els hepatòcits danyats també secreten citocines proinflamatòries, les quals promouen la inflamació hepàtica, activant les vies de senyalització de JNK i de NF- $\kappa$ B [319].

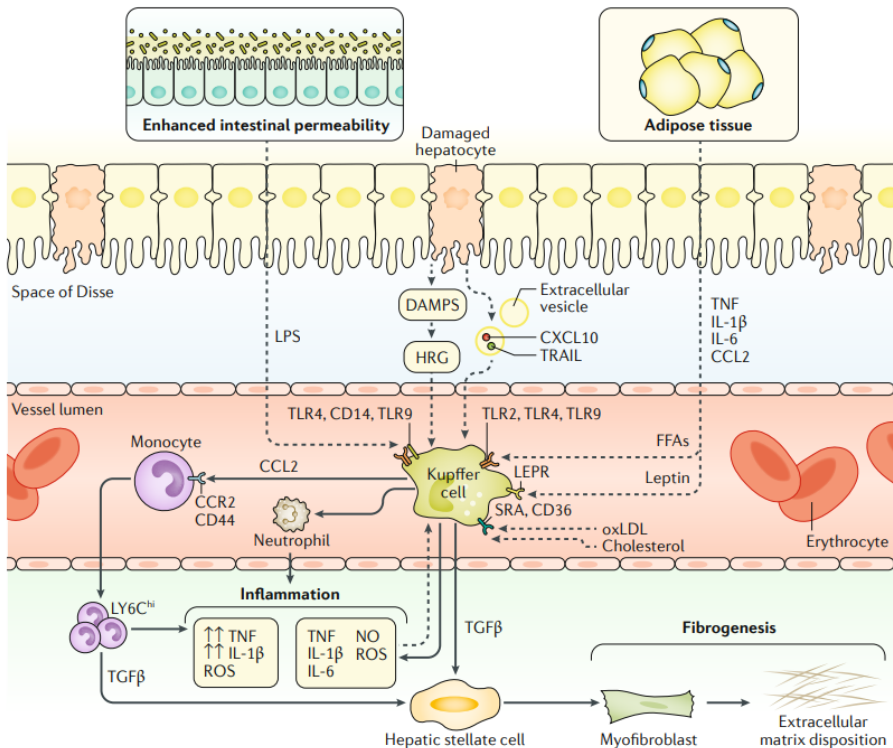
Tots aquests processos causen seriosos danys a l'hepatòcit, que acaba activant vies de senyalització de necrosis i apoptosi, les quals són importants acceleradors de la inflamació i de la fibrosi durant el desenvolupament de la NASH [331]. Però són les cèl·lules Kupffer, els macròfags residents del fetge, les que juguen un paper central en la inflamació hepàtica [337].

#### 1.2.2.2.2. Inflamació hepàtica

Múltiples factors poden provocar dany hepàtic i inflamació, com l'abús d'alcohol, els virus, les malalties autoimmunes o els factors prèviament esmentats.

Les cèl·lules de Kupffer són els macròfags residents del fetge, els quals representen el 10% de les cèl·lules hepàtiques. Se situen al lumen sinusoidal adherides a les cèl·lules endotelials, per ser una primera barrera als possibles estímuls provinents de la circulació sanguínia i amb capacitat per migrar a l'espai de Disse per orquestrar el reclutament d'altres cèl·lules inflamatòries i donar resposta a diferents patologies com l'hepatitis vírica, la colèstasi o la NASH [338,339].

Com es pot observar a la **Figura 16**, durant el desenvolupament de la NASH les cèl·lules de Kupffer són activades mitjançant els receptors de tipus Toll (TLR: *Toll-like receptors*) per diversos factors, com les endotoxines provinents de la microbiota intestinal, les DAMPs, les citocines proinflamàtores, entre altres [340].



**Figura 16:** Factors que activen els macròfags durant el desenvolupament de la NAFLD i la NASH. Diversos factors com per exemple les endotoxines derivades de la microbiota intestinal, el LPS, les molècules que secreten els hepatòcits danyats, els àcids grassos lliures o les adipoquines provinents del teixit adipós o el colesterol i el LDL oxidats activen les cèl·lules de Kupffer. Un cop activades, aquestes secreten citocines proinflamàtores, com el TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  o l'IL-6 i recluten a neutròfils i monòcits de la circulació via la CCL2. Els monòcits reclutats es diferencien a macròfags proinflamatoris per amplificar la inflamació hepàtica i contribuir a l'activació, via TGF- $\beta$ 1, de les HSC, les quals es transformen a miofibroblasts activats que depositen matriu extracel·lular i contribueixen a la fibrosi hepàtica. Figura extreta de: Kazankov, K. et al. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019 Mar;16(3):145-159.

Les cèl·lules Kupffer activades progressen al fenotip proinflamatori M1, secretant citocines proinflamàtores com l'IL-6 o el TNF- $\alpha$  i citocines profibròtiques com el factor de creixement transformant beta 1 (TGF- $\beta$ 1: *Transforming Growth Factor beta 1*) o l'IL-1 $\beta$  [339,340]. A més, mitjançant la MCP-1 o també anomenada CCL2, es recluten a altres cèl·lules inflamàtores cap al fetge, com per exemple, a neutròfils o a monòcits [340]. Els monòcits reclutats es diferencien a macròfags amb alt contingut de limfòcit antigen del complex 6 (LY6C<sup>hi</sup>: *Lymphocyte antigen 6 complex*), els quals són proinflamatoris i profibròtics, i juntament amb les cèl·lules de Kupffer activades, secreten TGF- $\beta$ 1, entre altres citocines, i activen a les cèl·lules estrellades del fetge (HSC: *Hepatic stellate cells*), les quals es diferencien a miofibroblasts (MFB). Les ROS, diversos mediadors lipídics i els cossos apoptòtics derivats dels hepatòcits danyats, també són factors que poden iniciar la diferenciació de les HSC a MFB [341]. Els MFB diferenciats expressen proteïnes profibròtiques que es dipositen a la matriu extracel·lular (MEC), d'aquesta manera s'inicia el procés de fibrosi hepàtica de la NASH [342,343].

### 1.2.2.3. Fibrosi hepàtica i cirrosi

En la majoria dels òrgans, la resposta a un dany es pot dividir en tres fases: la inflamació, la formació de nou teixit i el remodelatge del teixit [344], sent la reparació i la regeneració del teixit un punt crític, ja que una deposició excessiva de MEC pot generar cicatrius hipertròfiques i disfunció tissular [345]. Al fetge, després d'un dany, els mecanismes de reparació s'engeguen per reemplaçar als hepatòcits apoptòtics i necròtics, generant una cicatrització de les ferides i la regeneració del fetge [346]. Tot i això, si el dany persisteix al llarg del temps, es dona una acumulació excessiva de proteïnes de la MEC (col·làgens I, II i III, fibronectines, laminines, elastines, entre altres) que substitueixen les àrees de les parènquimes i es desenvolupa fibrosi hepàtica [346].

La fibrosi hepàtica és una conseqüència comuna de les malalties hepàtiques cròniques i d'un dany continuat, la qual està caracteritzada per una acumulació progressiva de MEC, amb un alt contingut de col·làgens fibril·lars,



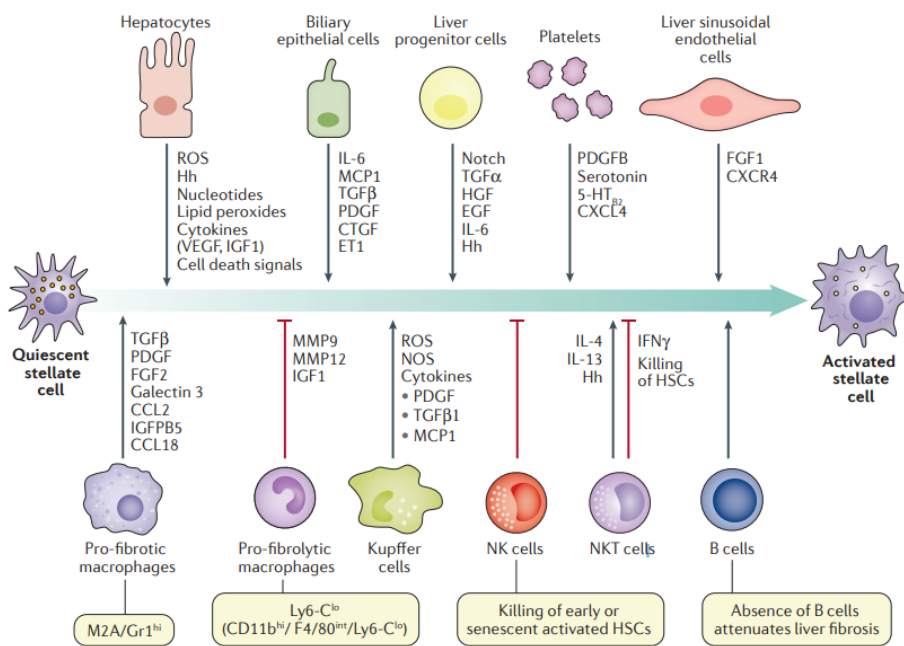
resultat del desequilibri entre la síntesi i la degradació de proteïnes de la matriu [347], degut a un procés reparatiu i regenerador del teixit [345]. Després d'un dany hepàtic, els mecanismes de reparació es posen en marxa per tal de reemplaçar als hepatòcits necrosats i apoptòtics, generant una resposta cicatritzant i d'inflamació que és essencial per la regeneració del fetge. Tot i això, si el dany hepàtic no cessa i persisteix al llarg del temps, l'acumulació excessiva de proteïnes de la MEC (col·làgens I, II i III, undulina, fibronectina, elastina, proteoglicans i hialuronan) poden reemplaçar les àrees de les parènquimes i fer progressar la fibrosi hepàtica a cirrosi [348]. La cirrosi està caracteritzada per una distorsió en l'arquitectura hepàtica, amb aparició de septes fibròtiques envoltades de nòduls regeneratius i una vasculatura alterada [341]. La cirrosi és un factor determinant en la morbiditat i mortalitat en pacients amb malalties hepàtiques, ja que predisposa a insuficiència hepàtica, hipertensió portal, alta susceptibilitat a patir una infecció i un alt risc a desenvolupar HCC [347,349].

La fibrosi hepàtica pot regressar quan el dany que la provoca cessa, sent reversible en estadis inicials de fibrosi [341]. De fet, s'han descrit un tipus de macròfags amb un baix contingut del marcador LY6C<sup>low</sup>, anomenats macròfags recuperadors, els quals presenten un augment de l'expressió de diferents metal·loproteïnases (MMPs), una disminució de l'expressió de citocines proinflamatòres i semblen ser anti-fibròtics, i que provoquen l'apoptosi de les HSC activades i són claus en la regressió de la fibrosi hepàtica [346].

Les cèl·lules HSC activades són la principal font de MEC durant la fibrosi hepàtica. Aquests cèl·lules, en un fetge normal, estan ubicades a l'espai de Disse, entre les cèl·lules endotelials sinusoidals del fetge i els hepatòcits, i representen un 10% de les cèl·lules que es troben al fetge [350,351]. En un fetge normal, les HSC presenten un fenotip quiescent no proliferatiu. En aquest estat les HSC acumulen lípids i vitamina A en gotes lipídiques, expressen gens adipogènics i marcadors neuronals i participen en diferents vies com la vasoregulació, el desenvolupament normal del fetge, el metabolisme del retinoide o mantenen la homeòstasis de la matriu extracel·lular. Quan existeix un dany hepàtic, tant agut com crònic, diferents senyals, les quals es mostren a la **Figura 17**, activen les HSC quiescents, aquestes es transdiferencien a un fenotip miofibroblàstic, a MFB, les

quals son cèl·lules proliferatives, a més, no es pot mantenir el balanç entre producció i degradació de MEC, generant fibrosi hepàtica [352].

Els MFB diferenciats perden l'acumulació de vitamina A i de lípids i expressen receptors per factors fibrogènics, quimiotàctics i mitogènics, incrementant la proliferació i supervivència de les HSC, la secreció de citocines i quimiocines, la síntesi de proteïnes de la matriu (normalment col·làgens fibril·lars), expressen l'alfa actina 2 (ACTA2 o també anomenada  $\alpha$ SMA: *Alpha smooth muscle actin*) i inhibidors tissulars de les metal·loproteïnases (TIMP: *Tissue inhibitors of metalloproteinases*), provocant una formació excessiva i progressiva de teixit cicatritzat [341,351]. Quan existeix un desequilibri entre la producció de MMPs, les quals degraden la MEC, i de TIMPs, els quals son inhibidors de les MMPs, s'observa producció excessiva de la MEC i es genera fibrosi hepàtica [353].



**Figura 17:** Diferents factors que activen les HSC. Diverses cèl·lules hepàtiques, com els hepatòcits, els macròfags, les cèl·lules biliars epitelials, entre altres, promouen (fletxes blaves) o inhibeixen (línies vermelles) l'activació de les HSC a MFB mitjançant la producció d'hormones, de citocines, de quimiocines, de ROS, de NOS, de factors de creixement o de metal·loproteïnases (MMP). Figura extreta de: Tsuchida, T i Friedman S.L. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017 Jul;14(7):397-411

Diversos factors de creixement estan associats a la transdiferenciació dels MFB, com el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*), angiotensina II, el factor de creixement del teixit connectiu (CTGF: *Connective Tissue Growth Factor*) i el TGF- $\beta$ 1, considerat aquest últim el factor fibrogènic més potent [354].

### 1.2.3. TGF- $\beta$ en la NAFLD

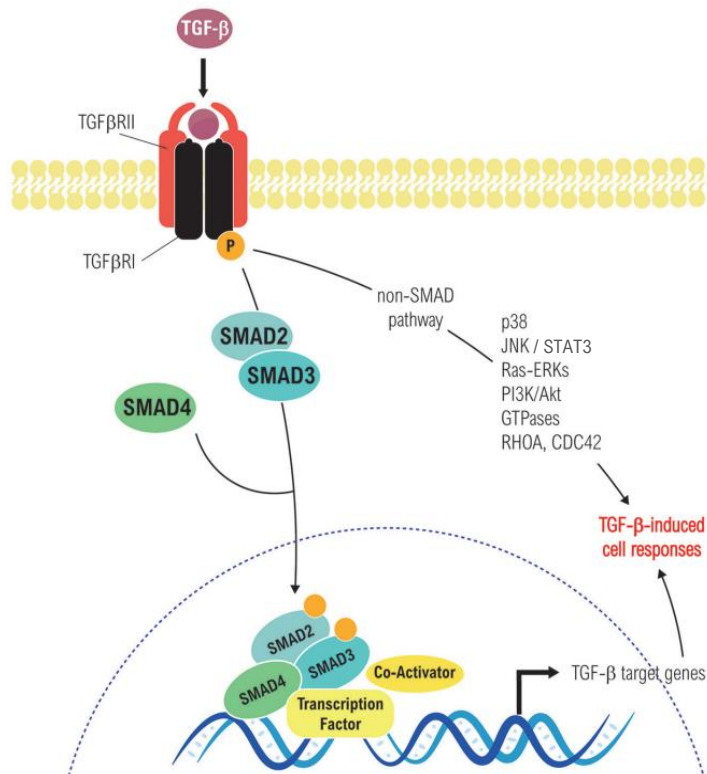
El TGF- $\beta$  forma part d'una superfamília de proteïnes relacionades estructural i funcionalment entre elles, en les quals hi ha les tres isoformes de TGF- $\beta$ : el TGF- $\beta$ 1, el TGF- $\beta$ 2 i el TGF- $\beta$ 3, les activines i les proteïnes morfogèniques òssies (BMPs) [355,356]. Les diferents isoformes del TGF- $\beta$  estan involucrades en diversos processos com la proliferació cel·lular, la diferenciació, l'adhesió o la mort cel·lular programada, i la seva via de senyalització està alterada en múltiples malalties [357]. Pacients amb NAFLD i NASH presenten nivells augmentats de TGF- $\beta$ 1 [358], els quals, després d'una cirurgia bariàtrica i d'una millora de marcadors metabòlics disminueixen [359]. El TGF- $\beta$ 1 juga un paper central en el desenvolupament de la NAFLD, des dels estadis més inicials del dany, passant per la inflamació i la fibrosi, fins als últims estadis de cirrosi o HCC [360–363].

El TGF- $\beta$ 1 està sintetitzat per diferents tipus cel·lulars del fetge, entre ells s'hi troben les HSC, les cèl·lules de Kupffer, els limfòcits, les cèl·lules endotelials del sinusoides i les cèl·lules epitelials biliars [364]. El TGF- $\beta$ 1 se sintetitza com un pro-pèptid que conté un pro-domini anomenat LAP (*Latency-associated peptide*) i el domini madur. Aquest pro-pèptid se secreta a la MEC, on es manté com una forma latent per donar una resposta ràpida unit a les proteïnes fixadores del TGF- $\beta$ 1 latent [365], finalment, diferents molècules de la MEC, com les MMPs, diferents proteases, entre altres activadors, realitzen una escissió proteolítica i alliberen la forma activa del TGF- $\beta$ 1 [348,365,366].

#### 1.2.3.1. Vies de senyalització del TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$ 1 actiu s'uneix al receptor tipus II de TGF- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ RII), el qual, es fosforila i forma un heterodímer amb el receptor tipus I de TGF- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ RI),

que és transfosforilat, i s'inicia la cascada de senyalització del TGF- $\beta$ 1. També existeix el receptor tipus III de TGF- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ RIII), el qual uneix amb baixa afinitat a TGF- $\beta$ 1 i el presenta als altres dos receptors [367]. Com es pot observar a la **Figura 18**, existeix la via de senyalització canònica de TGF- $\beta$ 1 i les vies no canòniques [348].



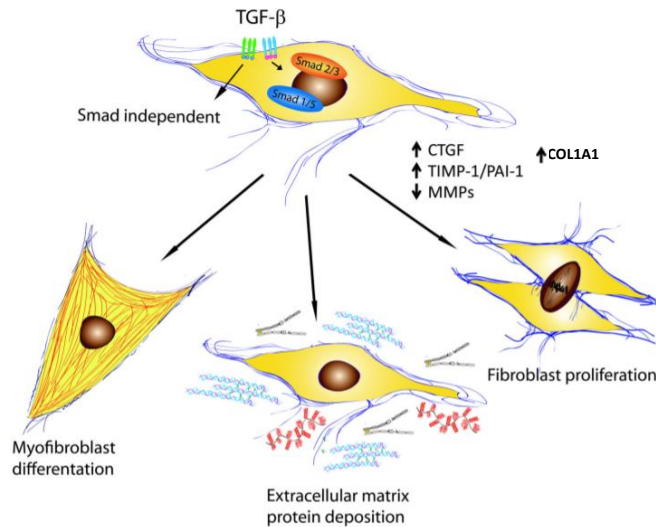
**Figura 18:** Vies de senyalització del TGF- $\beta$ 1. El complex TGF- $\beta$ 1-TGF $\beta$ RIII fosforilen al TGF $\beta$ RI i inicien les cascades de senyalització canònica, via els SMAD i la no canònica. Figura modificada de: *Fabregat I, i Caballero-Díaz D. Front Oncol. 2018 Sep 10;8:357.*

A la via de senyalització canònica hi estan implicats els receptors associats SMADs, dels quals n'existeixen tres tipus: els receptors SMAD, els SMAD cooperadors i els SMAD inhibidors. El complex activat de TGF- $\beta$ 1 i els seus receptors inicien la senyalització fosforilant als receptors associats SMAD2 i SMAD3, els quals perden la seva afinitat a les proteïnes que els retenen al citoplasma i exposen la senyal d'import al nucli [360,366]. Formen un complex amb el SMAD cooperador SMAD4 i transloquen cap al nucli, on, juntament amb

altres factors de transcripció, s'uneixen al promotor de diferents gens diana i els activa [355,361]. Entre aquests gens es troben el col·lagen tipus I i tipus III, proteïnes que es depositen a la MEC, però també hi ha els SMADs inhibidors: SMAD6 i SMAD7, els quals produeixen un *feedback* negatiu i auto-regulen la senyalització de TGF- $\beta$ 1 [368].

El TGF- $\beta$ 1 també du a terme la seva senyalització cel·lular independentment dels SMADs, per les vies que s'anomenen no canòniques, en les quals s'hi troben diferents cinases com les de la família de les cinases proto-oncogen tirocines (Src), la cinasa d'adhesió focal (FAK: *Focal Adhesion Kinase*), mediadors de la supervivència de la cèl·lula, com el factor de transcripció NF- $\kappa$ B, la via de senyalització del fosfoinositol 3-cinasa / proteïna cinasa B (coneguda com AKT) (PI3K/AKT), la via de les MAPK on s'hi troben ERK1/2 i p38 i la via de la JNK / STAT3 entre altres, que estan descrites a la **Figura 18**, i que acaben activant gens diana del TGF- $\beta$ 1 [361,366,369–372].

El TGF- $\beta$ 1 provoca diferents respostes segons el tipus cel·lular hepàtic que activa. A les HSC el TGF- $\beta$ 1 inicia la transdiferenciació a MFB, els quals comencen a produir components de la MEC. Als hepatòcits, el TGF- $\beta$ 1 indueix la mort cel·lular, fet que fa augmentar la inflamació i la fibrosi hepàtica, tanmateix, el TGF- $\beta$ 1 també inicia la transició epiteli-mesenquimal dels hepatòcits, els quals produeixen components de la MEC i afavoreixen al procés de la fibrosi hepàtica [355]. Durant el desenvolupament de la NAFLD, el TGF- $\beta$ 1 promou l'expressió de proteïnes de la MEC (col·làgens o fibronectina), mitiga l'expressió de proteases que destrueixen la MEC (col·lagenases o MMPs) i indueix l'expressió dels TIMPs, és a dir, el TGF- $\beta$ 1 decanta la balança entre la síntesi i la degradació de la MEC, induint una acumulació excessiva de MEC i provocant fibrosi hepàtica **Figura 19** [341,351].



**Figura 19:** Efectes del TGF- $\beta$ 1 a les HSC. El TGF- $\beta$ 1 activa les HSC les quals es diferencien a MFB, proliferen i augmenten l'expressió de proteïnes de la MEC, com el col·lagen tipus I, augmenten l'expressió dels TIMPs i disminueixen l'expressió de MMPs provocant un desequilibri entre síntesi i degradació de la MEC, desenvolupant fibrosi hepàtica. Figura modificada de: *Biernacka, A. et al. Growth Factors. 2011;Oct; 29(5):196-202*

### 1.3. Models animals per l'estudi de la fibrosi hepàtica

Els ratolins, de forma natural, no desenvolupen fibrosi hepàtica, això ha provocat que, per estudiar la fibrosi hepàtica *in vivo*, s'hagin desenvolupat diversos models animals utilitzant agents químics que la indueixen. Entre aquests agents químics inductors de fibrosi hepàtica es troben: el consum d'alcohol, la injecció intraperitoneal (ip) de tetraclorur de carboni ( $\text{CCl}_4$ ) i la injecció ip de tioacetamida. El model de dany hepàtic provocat per injecció ip de  $\text{CCl}_4$  un dels més utilitzats en ratolins per induir fibrosi hepàtica [373–375].

#### 1.3.1. Tetraclorur de carboni ( $\text{CCl}_4$ )

El  $\text{CCl}_4$  arriba al fetge, es metabolitza per la família de les CYPs i es produeix el radical triclorometil ( $\text{CCl}_3^*$ ), el qual desencadena diverses reaccions que produeixen radicals lliures i està implicat en el procés de la peroxidació lipídica [376]. Existeixen diferències en la susceptibilitat al  $\text{CCl}_4$  segons la soca de ratolí

utilitzada, sent la soca BALB/c la més susceptible i que genera fibrosi hepàtica amb només quatre setmanes d'injeccions ip de CCl<sub>4</sub> dues vegades per setmana. En canvi, la soca de ratolins C57BL/6 presenta una susceptibilitat intermèdia, però aquesta soca de ratolins ha estat àmpliament utilitzada per estudiar la fibrosi hepàtica provocada pel CCl<sub>4</sub>, degut a la gran disponibilitat de ratolins modificats genèticament produïts en aquesta soca. Els ratolins C57BL/6 desenvolupen fibrosi hepàtica entre les 4 i 6 setmanes d'injeccions ip de CCl<sub>4</sub> realitzades dues vegades per setmana [376].

En múltiples estudis s'ha vist que el CCl<sub>4</sub> mimetitzava en molts aspectes al desenvolupament de la fibrosi hepàtica observada a les malalties cròniques associades al dany hepàtic que ocorren en humans. La injecció ip de CCl<sub>4</sub> induïx necrosi centro-lobular dels hepatòcits, provoca una resposta de cicatrització del teixit, un reclutament de cèl·lules inflamatòries, l'activació de les cèl·lules de Kupffer i una inducció de la resposta inflamatòria [377]. Aquesta seqüència de processos desencadena la producció de múltiples citocines, entre elles, s'observa un augment del factor de creixement TGF- $\beta$ 1 [378,379], es promou l'activació de les HSC i es desenvolupa fibrosis hepàtica [375].







# HIPÒTESIS I OBJECTIUS



## 2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Els nivells plasmàtics de la SHBG en individus sans poden ser modificats per diversos factors nutricionals. A més, individus que pateixen diverses malalties, com per exemple la NAFLD o la NASH, presenten nivells plasmàtics disminuïts de SHBG.

En aquest sentit, la primera hipòtesi d'aquest treball és que la SHBG hepàtica es troba regulada per diversos factors nutricionals.

**Objectiu 1:** Estudi de la regulació hepàtica de la SHBG per la cafeïna i cerca dels mecanismes moleculars involucrats en aquesta regulació

**Objectiu 2:** Anàlisi de l'efecte del contingut en resveratrol dels vins negres en humans en els nivells plasmàtics de la SHBG i en altres paràmetres bioquímics.

La segona hipòtesis d'aquest treball és que l'expressió de la SHBG es troba alterada durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica.

**Objectiu 3.** Anàlisi de la regulació hepàtica de la SHBG durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica i estudi dels mecanismes moleculars implicats.

3.1. Estudiar l'expressió hepàtica de la SHBG en el model animal de fibrosi per dany hepàtic produït per injecció de CCl<sub>4</sub>.

3.2. Analitzar els mecanismes moleculars implicats en la regulació hepàtica de la SHBG durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica.



# RESULTATS



### 3. RESULTATS

#### 3.1. Estudi de la regulació de la SHBG per factors nutricionals i cerca dels mecanismes moleculars involucrats: la cafeïna

Diversos estudis epidemiològics mostren una correlació positiva entre el consum de cafè i de productes amb cafeïna i els nivells plasmàtics de la SHBG. En aquest estudi es va analitzar si la cafeïna regulava l'expressió hepàtica de la SHBG.

En primer lloc es va realitzar un estudi *in vitro* amb les cèl·lules HepG2, les quals van ser tractades, durant tres dies, amb dues concentracions de cafeïna (100 i 500  $\mu$ M) o amb vehicle (aigua) i no es va observar diferències en els nivells d'expressió d'ARNm de la SHBG ni en els nivells proteics al medi. Paral·lelament, es va realitzar l'estudi *in vivo*, amb els ratolins transgènics per la SHBG humana, els quals van ser tractats durant dotze dies amb cafeïna (0.1 mg/ml) o amb vehicle (aigua). Els nivells plasmàtics de la SHBG estaven augmentats significativament als animals tractats amb cafeïna, comparats amb els nivells dels animals vehicle. De la mateixa manera, al finalitzar el tractament, els animals tractats amb cafeïna presentaven nivells augmentats de l'expressió hepàtica de la SHBG. Per tant, es va deduir que la cafeïna regulava indirectament l'expressió hepàtica de la SHBG.

En un estudi anterior, realitzat al nostre laboratori, s'havia determinat que la SHBG hepàtica estava regulada per l'adiponectina. A més, diversos estudis epidemiològics mostren una correlació positiva del consum de cafeïna i els nivells d'adiponectina en plasma. Per aquest motiu, es va estudiar si la cafeïna regulava l'expressió de l'adiponectina al teixit adipós i, en conseqüència, la SHBG al fetge. Primerament, es van mesurar els nivells plasmàtics d'adiponectina dels animals tractats amb cafeïna i es va observar un augment significatiu d'aquests nivells respecte els que presentaven els animals vehicle. A més, el tractament amb cafeïna augmentava l'expressió d'adiponectina al teixit adipós blanc, tant a nivell d'ARNm com a nivell de proteïna.

Aquests resultats es van confirmar *in vitro*, utilitzant la línia cel·lular d'adipòcits de ratolí 3T3-L1. Es van tractar les cèl·lules 3T3-L1 diferenciades a



adipòcits amb cafeïna durant tres dies, a les dues concentracions utilitzades durant els tractaments a les cèl·lules HepG2 (100 i 500 µM) i es va observar que la cafeïna augmentava significativament l'expressió d'adiponectina i la seva secreció al medi.

Està descrit que l'adiponectina regula l'expressió hepàtica de la SHBG augmentant els nivells d'HNF-4α al fetge, per tant, es va procedir a analitzar els nivells d'aquest factor de transcripció als fetges dels ratolins tractats amb cafeïna i es va observar que el tractament amb cafeïna augmentava els nivells hepàtics d'HNF-4α, tant a nivell d'ARNm com de proteïna.

Finalment, es va estudiar el mecanisme molecular pel qual la cafeïna augmentava l'expressió d'adiponectina al teixit adipós, utilitzant la línia cel·lular 3T3-L1, i es va observar que el tractament amb cafeïna augmentava els nivells de FoxO1, un factor de transcripció implicat en la regulació de l'expressió d'adiponectina al teixit adipós, i disminuïa els nivells de pFoxO1, mitjançant la disminució dels nivells de pAKT. Aquests resultats es van corroborar *in vivo*, on es van observar nivells disminuïts de pAKT i nivells augmentats de FoxO1 al teixit adipós dels animals tractats amb cafeïna.

Aquest estudi va permetre esbrinar que la cafeïna augmenta els nivells de la SHBG plasmàtica de manera indirecta, augmentant els nivells d'adiponectina al teixit adipós via AKT/FoxO1. L'augment dels nivells d'adiponectina augmenta els nivells d'HNF-4α al fetge, els quals incrementen l'expressió hepàtica de la SHBG. Aquests resultats expliquen els mecanismes moleculars pels quals s'observa una correlació positiva entre el consum de cafeïna i els nivells plasmàtics de la SHBG.

#### Resultats de l'article:

"Caffeine Upregulates Hepatic Sex Hormone-Binding Globulin Production by Increasing Adiponectin Through AKT/FOXO1 Pathway in White Adipose Tissue." Laura Briansó-Llort, Lidia Fuertes-Rioja, Lorena Ramos-Perez, Cristina Hernandez, Rafael Simó and David M. Selva. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2020 Sep; 64(17):e1901253. DOI: [10.1002/mnfr.201901253](https://doi.org/10.1002/mnfr.201901253). Epub 2020 Jul 23

### 3.2. Estudi pilot de l'efecte del contingut de resveratrol dels vins negres en els nivells plasmàtics de la SHBG

En diversos estudis s'ha observat que la dieta Mediterrània redueix el risc de patir malalties cardiovasculars (CVD) i el consum de vi negre, component important d'aquesta dieta, també s'ha associat a un risc menor de desenvolupar CVD, el qual s'ha atribuït als diferents compostos polifenòlics presents al vi negre.

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxitransestilbè) (RSV) és un membre de la família dels estilbens dels compostos dels polifenols amb propietats antioxidants i considerat com un agent protector contra el desenvolupament de malalties com les CVD, el càncer i, a més, s'ha observat que protegeix contra les conseqüències d'un consum de dietes riques en greix. El RSV es troba en diverses plantes, així com a la pell del raïm, i el vi negre presenta de 5 a 20 vegades més quantitat de RSV que el vi blanc.

En un estudi previ realitzat al nostre laboratori, mitjançant experiments *in vitro* amb les cèl·lules HepG2, es va observar que el tractament amb vi negre augmentava l'expressió de la SHBG, en canvi, el tractament amb vi blanc no afectava als nivells d'expressió de la SHBG. En aquest estudi es va demostrar que el tractament amb RSV augmentava l'expressió de la SHBG activant el receptor constitutiu de l'androstà (CAR) humà, el qual s'uneix al promotor de la SHBG a l'element DR1 (GGGTCAAGGGTCA), situat a 70 pb *upstream* del promotor proximal, i activa l'expressió de la SHBG. Aquets resultats es van observar tant *in vitro* com *in vivo*, utilitzant el ratolí transgènic per la SHBG humana. A més, en el mateix estudi, es va observar una correlació positiva entre nivells d'expressió de CAR i de SHBG hepàtics en mostres humanes hepàtiques.

Per aquesta raó, l'objectiu d'aquest estudi va ser analitzar si el contingut en RSV dels vins negres modificava els nivells plasmàtics de la SHBG en humans. Es va dur a terme un estudi pilot amb vint-i-sis voluntaris sans (quinze homes i onze dones), els quals van ingerir 187 ml diaris d'un vi negre amb un baix contingut en RSV (Wine\_10) durant dues setmanes, van descansar durant una setmana i van procedir a ingerir 187 ml d'un vi negre amb un alt contingut amb RSV (Wine\_4) durant dues setmanes. A l'inici i al final de cada tractament es va

recollir sang per tal d'analitzar els nivells plasmàtics de la SHBG i el perfil metabòlic.

El consum moderat de vi negre durant dues setmanes, tant amb un alt contingut en RSV com amb un baix contingut en RSV, no modificava l'índex de massa corporal, ni els nivells plasmàtics de glucosa i triglicèrids dels voluntaris. A més, tampoc s'observaven alterats els paràmetres de dany hepàtic com l'aspartat aminotransferasa o l'alanina aminotransferasa. Si que es va observar una disminució significativa dels nivells de colesterol total en sang, tant en homes com en dones, després d'ingerir el vi negre ric en RSV (Wine\_4). A més, el consum moderat de vi negre ric en RSV augmentava significativament els nivells plasmàtics de la SHBG en dones, però no s'observava modificació dels nivells de la SHBG en homes. En canvi, el consum del vi negre amb un baix contingut en RSV (Wine\_10) no modificava els nivells plasmàtics de la SHBG ni de cap paràmetre analitzat, ni en homes ni en dones.

En aquest estudi pilot es va observar que el consum moderat de vi negre ric en RSV disminueix significativament els nivells totals de colesterol en sang, en homes i en dones, i que, en dones, també s'observa un augment significatiu dels nivells plasmàtics de la SHBG. Aquests resultats obren la porta a realitzar un estudi clínic amb més participants per tal de determinar si el contingut en RSV dels vins negres i l'efecte que aquest té en els nivells plasmàtics de la SHBG juguen un paper significatiu en les accions beneficioses sobre les malalties CVD que presenta el consum moderat de vi negre.

#### **Resultats de l'article:**

“Effect of Resveratrol Content in Red Wine on Circulating Sex Hormone-Binding Globulin: Lessons from a Pilot Clinical Trial.” Laura Briansó-Llort, Olga Simó-Servat, Lorena Ramos-Perez, Javier Torres-Torronteras, Cristina Hernandez, Rafael Simó and David M. Selva. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2022 Aug; 66(16):e2200125. DOI: [10.1002/mnfr.202200125](https://doi.org/10.1002/mnfr.202200125). Epub 2022 Jul 1

### 3.3. Anàlisi de la regulació hepàtica de la SHBG en la fibrosi hepàtica i estudi dels mecanismes moleculars implicats.

La malaltia de fetge gras no alcohòlic (NAFLD) és un espectre de malalties que progressen de l'esteatosi simple, a la esteatohepatitis (NASH) on, a més d'esteatosi, hi ha presència d'inflamació i fibrosi, i que poden arribar a estadis més greus com la cirrosi o l'hepatocarcinoma (HCC). Els pacients amb NAFLD i NASH presenten nivells disminuïts de la SHBG. En un estudi previ dut a terme al nostre laboratori es va determinar que durant el desenvolupament del primer estadi de la malaltia, l'esteatosi, els nivells de la SHBG es trobaven disminuïts per una reducció dels nivells del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$  i un augment dels nivells de PPAR $\gamma$ . Tot i això, encara no s'ha estudiat la regulació de la SHBG en estadis més avançats, com és la fibrosi hepàtica.

En aquest estudi es va analitzar la regulació hepàtica de la SHBG durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica. Es va utilitzar el model animal d'inducció de fibrosi hepàtica per injeccions intraperitoneals de CCl<sub>4</sub>, utilitzant ratolins transgènics per la *SHBG* humana. També es van realitzar estudis *in vitro*, amb la línia cel·lular HepG2.

Un grup de mascles i femelles de ratolins transgènics per la *SHBG* humana van ser tractats amb CCl<sub>4</sub> dues vegades per setmana durant quatre setmanes i un altre grup de mascles i femelles van ser tractats amb vehicle (oli d'oliva). L'anàlisi dels talls histològics de fetge tenyits amb PicroSirius Red va revelar que els animals tractats amb CCl<sub>4</sub> presentaven fibrosi hepàtica. A més, aquests animals presentaven nivells d'expressió d'ARNm i de proteïna de COL1A1 significativament augmentats comparats amb els animals vehicle.

Respecte a la regulació de la SHBG, el tractament amb CCl<sub>4</sub> disminuïa significativament els nivells plasmàtics de la SHBG, en comparació amb el grup control (vehicle). De la mateixa manera, els nivells d'expressió de la *SHBG* al fetge estaven significativament disminuïts als animals tractats amb CCl<sub>4</sub>. Aquests animals també presentaven una disminució significativa, tant dels nivells d'ARNm com de proteïna, d'HNF-4 $\alpha$ , factor de transcripció important en la regulació hepàtica de la SHBG.

El TGF- $\beta$ 1 juga un paper important durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica, per aquest motiu, es van analitzar els nivells d'aquest factor i es va observar que estaven augmentats significativament al fetge dels animals tractats amb CCl<sub>4</sub>, tant a nivell d'ARNm com de proteïna. Tot seguit es va estudiar si el TGF- $\beta$ 1 regulava la producció hepàtica de la SHBG, tractant les cèl·lules HepG2 amb TGF- $\beta$ 1 (5, 10 i 20 ng/ml) o amb vehicle (PBS) durant tres dies. El tractament amb TGF- $\beta$ 1 disminuïa significativament els nivells de la SHBG, tant a nivell de proteïna com d'ARNm, mitjançant les vies del SMAD3 i del STAT3 a través del receptor tipus I de TGF- $\beta$ 1. Un bloqueig de l'activació del receptor tipus I de TGF- $\beta$ 1, retornava els nivells de la SHBG a la normalitat. Tot i això, realitzant un estudi de luciferasa de l'activitat del promotor de la SHBG es va determinar que un tractament de curta durada (dues hores) amb TGF- $\beta$ 1 (20 ng/ml) no variava l'activitat del promotor de la SHBG, encara que s'observés activació de les vies del SMAD3 i del STAT3. Finalment, es va determinar que el TGF- $\beta$ 1 disminueix la SHBG de forma indirecta, disminuint significativament els nivells de les isoformes provinents del promotor 1 d'HNF-4 $\alpha$  i augmentant les isoformes provinents del promotor 2, les quals, mitjançant un estudi de luciferasa es va observar que presentaven menys poder transcripcional que les P1-HNF-4 $\alpha$ .

Aquests resultats van ser confirmats *in vivo*, tractant a un grup de mascles i femelles de ratolins transgènics per la SHBG humana amb TGF- $\beta$ 1 (5  $\mu$ g/kg) i un altre grup amb vehicle (PBS) durant cinc dies. El tractament amb TGF- $\beta$ 1 disminuïa significativament els nivells de SHBG i d'HNF-4 $\alpha$  i s'observava un augment dels nivells de pSTAT3.

Aquest estudi va permetre determinar que el TGF- $\beta$ 1, el qual es troba augmentat durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica, disminueix la producció de la SHBG al fetge provocant una disminució dels nivells de les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$  i un augment de les isoformes P2-HNF-4 $\alpha$ , mitjançant les vies de dels SMADs i del STAT3 a través dels receptors del TGF- $\beta$ 1. Aquests resultats assenyalen al TGF- $\beta$ 1 com un factor que podria estar implicat en els baixos nivells de la SHBG plasmàtica observats en pacients amb NASH i fibrosi hepàtica.

**Resultats de l'article:**

“Transforming growth factor-beta 1: A new factor reducing hepatic SHBG production in liver fibrosis.” Laura Briansó-Llort, Lidia Fuertes-Rioja, Lorena Ramos-Perez, Maria Teresa Salcedo-Allende, Cristina Hernandez, Rafael Simó and David M. Selva. *Journal of Cellular Physiology*. 2022 Jun; 27 DOI: [10.1002/jcp.30818](https://doi.org/10.1002/jcp.30818)



# DISCUSSION





## 4. DISCUSSIÓ

### 4.1. Estudi de la regulació de la SHBG per factors nutricionals i cerca dels mecanismes moleculars involucrats: la cafeïna

Des de fa anys, el nostre laboratori ha estudiat diferents factors nutricionals que regulen la producció de la SHBG hepàtica i n'ha determinat el mecanisme molecular involucrat, com per exemple les dietes riques en greix, el consum d'oli d'oliva o el resveratrol (RSV) [75,104,269]. En diverses malalties metabòliques la SHBG es troba disminuïda [48] i l'estudi de factors nutricionals que augmentin aquests nivells és de gran interès per les implicacions terapèutiques associades a la SHBG [219–221]. Existeixen evidències epidemiològiques que relacionen una correlació positiva entre el consum de productes amb cafeïna i els nivells plasmàtics de la SHBG [285–292,380]. Per aquest motiu, en aquest estudi es va analitzar si la cafeïna regulava la producció hepàtica de la SHBG i se'n van determinar els mecanismes moleculars implicats.

Els ratolins adults no presenten expressió hepàtica de la *Shbg*, els quals només l'expressa a les cèl·lules de Sertoli dels testicles [79]. Als anys noranta, Jänne *et al.* (1998) van generar els ratolins transgènics per la *SHBG* humana, els quals expressen la SHBG humana al fetge sota la regulació del seu propi promotor proximal [54], els quals son utilitzats per l'estudi de la regulació hepàtica de la SHBG. El tractament durant quinze dies amb cafeïna al ratolí transgènic per la *SHBG* humana augmentava els nivells plasmàtics de la SHBG, de la mateixa manera, es va observar que l'expressió d'ARNm de la *SHBG* estava augmentada als fetges dels ratolins tractats respecte als animals control (vehicle), confirmant el que estudis epidemiològics havien descrit, que el consum de cafeïna augmenta la producció hepàtica de la SHBG [286,291,292,380].

Per esbrinar els mecanismes moleculars pels quals la cafeïna augmenta els nivells d'expressió hepàtica de la SHBG, es van realitzar estudis *in vitro* amb les cèl·lules HepG2, el tractament diari amb cafeïna durant tres dies amb dues concentracions de cafeïna (100 i 500  $\mu$ M), les quals correspondrien als nivells de cafeïna que arriben al fetge després d'un consum d'una tassa (100  $\mu$ M) o de

quatre tasses de cafè (500 µM) [381] no modificava la producció hepàtica de la SHBG. A més, no es veia afectat el contingut de triglicèrids de les HepG2, contràriament al que s'havia observat a un estudi anterior [382]. La discrepància entre aquests resultats es podria explicar perquè a l'estudi anterior es van tractar les cèl·lules HepG2 amb concentracions elevades de cafeïna (2 i 4 mM), les quals corresponen a nivells difícils d'aconseguir amb un consum de cafè o de productes amb cafeïna [381]. A més, altres estudis han demostrat que el tractament amb cafeïna a concentracions superiors a 600 µM comprometen la viabilitat cel·lular de les HepG2 [383,384], fet que podria explicar la baixada del contingut en triglicèrids observats a l'estudi on es van tractar les cèl·lules HepG2 amb cafeïna a altes concentracions (2 i 4 mM) [382]. En canvi, les concentracions de cafeïna utilitzades al nostre estudi no afectaven la viabilitat cel·lular de les cèl·lules HepG2.

Els resultats obtinguts *in vitro*, on el tractament amb cafeïna a les cèl·lules HepG2 no modifica els nivells de la SHBG i els obtinguts *in vivo*, on el tractament amb cafeïna augmenta els nivells plasmàtics de la SHBG als ratolins transgènics per la *SHBG* humana, suggereixen que la cafeïna no regula directament la producció hepàtica de la SHBG, sinó que ho fa de forma indirecta, amb la implicació d'algun altre teixit.

Diversos estudis han demostrat que la cafeïna inhibeix la diferenciació dels adipòcits i indueix la lipòlisi al teixit adipós [385–388]. El teixit adipós està caracteritzat per secretar diverses citocines proinflamatòries com el TNF-α i l'IL-1β i citocines antiinflamatòries com l'adiponectina [108,389]. En estudis previs realitzats al nostre grup s'ha demostrat que el TNF-α i l'IL-1β redueixen l'expressió hepàtica de la SHBG, disminuint els nivells del factor de transcripció HNF-4α [106,260] i que l'adiponectina augmenta la producció hepàtica de la SHBG, mitjançant l'increment del factor de transcripció HNF-4α [108]. Tot i això, no està demostrada la relació entre el consum de cafeïna i els nivells de TNF-α o d'IL-1β [390], en canvi, diversos estudis epidemiològics mostren que el consum de cafeïna en humans correlaciona positivament amb els nivells plasmàtics d'adiponectina [291,391–395]. Aquests resultats van ser corroborats al nostre estudi, on els ratolins transgènics per la *SHBG* humana tractats amb cafeïna

presentaven nivells significativament augmentats d'adiponectina en sang, comparats amb els que presentaven els ratolins controls (vehicle). A més, s'observava un augment dels nivells d'expressió d'ARNm d'adiponectina al teixit adipós dels ratolins tractats amb cafeïna, en comparació amb els ratolins control (vehicle).

Aquests resultats van ser confirmats *in vitro* on el tractament amb cafeïna a les cèl·lules 3T3-L1, adipòcits de ratolí diferenciats, també augmentava els nivells d'adiponectina. La cafeïna és un antagonista natural del receptor de l'adenosina i està descrit que molts dels efectes provocats per la cafeïna són mediatos per aquest receptor [396,397]. Per aquest motiu, es van co-tractar les cèl·lules 3T3-L1 amb cafeïna i adenosina. El co-tractament amb adenosina era capaç de bloquejar l'augment de la producció d'adiponectina induïda per la cafeïna, suggerint que els efectes de la cafeïna són mediatos pel receptor de l'adenosina, com prèviament ja ha estat descrit a la literatura [398].

La regulació de l'expressió de l'adiponectina al teixit adipós ha estat àmpliament estudiada durant els últims anys. L'adiponectina pot estar regulada tant a nivell transcripcional com post-transcripcional [399,400] i són diversos els factors de transcripció que en regulen la seva expressió, com per exemple PPAR $\gamma$  [400,401] o FoxO1 [399,400,402]. Al nostre estudi, el tractament amb cafeïna a les cèl·lules 3T3-L1 no modificava els nivells del factor de transcripció PPAR $\gamma$ , en canvi, s'observava un augment dels nivells de FoxO1.

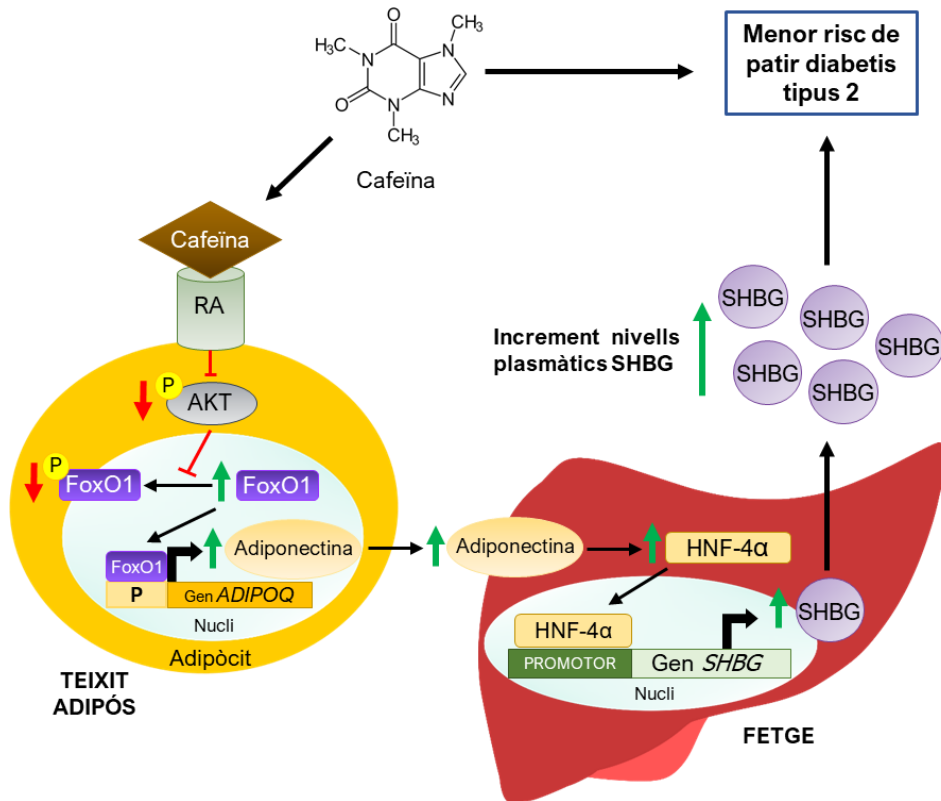
FoxO1 és un factor de transcripció que està altament expressat al teixit adipós i que regula processos com la diferenciació dels adipòcits, la defensa davant l'estrès oxidatiu o el metabolisme dels lípids [403]. Quan no està fosforilat es localitza al nucli i és capaç d'unir-se als seus gens diana i activar-los, com per exemple, a l'adiponectina [399,400,402]. L'AKT pot fosforilar a FoxO1 i inactivar-lo, la forma fosforilada de FoxO1 (pFoxO1) transloca cap al citoplasma, on es pot unir a una proteïna adaptadora, la qual el manté al citoplasma de forma inactiva, o pot ser degradat pel proteasoma [404,405]. Al nostre estudi es va demostrar, tant en experiments *in vitro* amb la línia cel·lular 3T3-L1, com en experiments *in*

*vivo* amb el ratolí transgènic per la *SHBG* humana, que el tractament amb cafeïna reduïa els nivells d'AKT fosforilat i de pFoxO1 i s'observava un augment dels nivells de FoxO1 totals, conseqüentment s'activava l'expressió d'adiponectina al teixit adipós. A més, el co-tractament amb adenosina revertia els efectes causats per la cafeïna, reforçant la hipòtesi de que els efectes provocats per la cafeïna son dependents del receptor de l'adenosina.

Diversos estudis epidemiològics han demostrat una correlació positiva entre els nivells plasmàtics de la *SHBG* i els nivells d'adiponectina [257–259]. A més, en un estudi anterior dut a terme al nostre laboratori es van descriure els mecanismes moleculars pels quals l'adiponectina augmenta l'expressió hepàtica de la *SHBG* [108]. L'adiponectina s'uneix al seu receptor a la membrana dels hepatòcits i augmenta els nivells del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$  [108]. Es van analitzar els nivells d'HNF-4 $\alpha$  dels fetges dels ratolins tractats amb cafeïna i es va observar que aquests animals presentaven un augment significatiu dels nivells d'HNF-4 $\alpha$  respecte els animals control (vehicle).

En conclusió, en aquest estudi s'ha pogut determinar que la cafeïna incrementa l'expressió hepàtica de la *SHBG* indirectament, augmentant la producció d'adiponectina al teixit adipós, mitjançant la via de senyalització AKT/FoxO1. L'augment dels nivells d'adiponectina augmenta els nivells del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$  al fetge, el qual augmenta l'expressió hepàtica de la *SHBG* (Figura 20).

Aquest estudi aporta els mecanismes moleculars que expliquen la correlació positiva observada en diversos estudis epidemiològics entre el consum de cafeïna i l'augment dels nivells plasmàtics de la *SHBG* que poden ser els responsables del menor risc associat de patir DMT2 dels consumidors de cafè, com apunten alguns altres estudis [286,292].



**Figura 20:** Mecanismes moleculars pels quals la cafeïna incrementa els nivells plasmàtics de la SHBG. La cafeïna incrementa els nivells plasmàtics de la SHBG de manera indirecta, mitjançant l'augment de l'expressió al teixit adipós de l'adiponectina a través de la via de senyalització AKT / FoxO1. L'adiponectina al fetge augmenta els nivells del factor de transcripció HNF-4α el qual incrementa l'expressió de la SHBG. RA: Receptor d'adenosina

#### 4.2. Estudi pilot de l'efecte del contingut de resveratrol dels vins negres en els nivells plasmàtics de la SHBG

El consum moderat de vi negre és una característica de la dieta Mediterrània [406], la qual ha estat associada a efectes beneficiosos en malalties com el síndrome metabòlic o les malalties cardiovasculars [407–410]. En diversos estudis s'apunta al consum de vi negre com un dels factors responsable del baix risc de desenvolupar síndrome metabòlic i CVD de la Dieta Mediterrània [411–414]. Concretament, el resveratrol (RSV), un antioxidant present als vins negres, s'ha descrit com un agent protector contra el desenvolupament de malalties CVD, càncer o de mitigar les conseqüències del consum de dietes riques en greix [274–279,415]. En diversos estudis s'ha observat que la SHBG es troba disminuïda en pacients que pateixen malalties metabòliques i els nivells baixos de la SHBG són un predictor del risc cardiovascular [202,203,416].

A més, en un estudi previ realitzat al nostre laboratori es va poder determinar que el tractament amb vi negre a cèl·lules HepG2 augmentava l'expressió de la SHBG, en canvi, el tractament amb vi blanc no modificava els nivells d'expressió de la SHBG [75]. En el mateix estudi es va observar que el tractament amb RSV, el qual està vint vegades més concentrat als vins negres que als vins blancs [273], augmentava l'expressió de la SHBG activant el CAR humà, el qual dimeritza amb RXR i s'uneix al DR1, situat a 70 pb del promotor del gen de la *SHBG* [75]. També es va observar una correlació positiva entre els nivells d'expressió hepàtics de *CAR* i de *SHBG* en biòpsies humanes. Tot i això, encara no s'ha estudiat si el consum de vins negres rics en RSV modula els nivells plasmàtics de la SHBG en humans.

En aquest estudi pilot es van testar dos vins negres, un amb un baix contingut en RSV (1 mg/ml) i un altre amb un alt contingut en RSV (5.9 mg/ml) i es va observar que el vi negre amb un baix contingut en RSV no modificava cap dels paràmetres bioquímics analitzats. En canvi, el consum de vi negre amb un alt contingut en RSV era capaç de reduir el nivells totals de colesterol en sang, tant en homes com en dones, i incrementava els nivells plasmàtics de la SHBG, però en aquest cas només en dones.

La reducció significativa dels nivells de colesterol observats, tant en homes com en dones, després del consum moderat de vi negre ric en RSV es troba en concordança amb el que s'ha descrit en altres estudis i que està recollit en un meta-anàlisi recent sobre l'efecte de la suplementació amb RSV sobre el perfil lipídic, on s'observa una disminució del colesterol total després del tractament amb RSV [417]. En altres estudis recents, la suplementació amb RSV també provoca una disminució dels nivells dels triglicèrids plasmàtics [418]. Al nostre estudi també s'observa una baixada dels triglicèrids plasmàtics després del consum del vi negre ric en RSV, però aquesta disminució no és significativa, degut a la gran variabilitat d'aquesta mesura entre els individus, fet que posa de manifest una de les limitacions del nostre estudi pilot, el qual només compta amb la participació de vint-i-sis voluntaris sans, sent una mostra baixa que es podria augmentar en futures investigacions.

A més, a la literatura està descrit que el consum d'alcohol incrementa els nivells plasmàtics de colesterol de baixa densitat (HDL) [419–422], fet que no s'observa al nostre estudi. Aquestes diferències entre estudis pot ser explicada perquè els altres estudis comparaven els nivells d'HDL entre bevedors i no bevedors d'alcohol, mentre que al nostre estudi tot els participants bevien alcohol. També pot ser explicar per les diferències entre el disseny i la duració dels estudis o les característiques dels vins utilitzats.

En relació als nivells plasmàtics de la SHBG, en homes, cap dels vins analitzats al nostre estudi modificava els nivells plasmàtics de la SHBG, en canvi, en dones, el vi negre amb un baix contingut en RSV no variava es nivells de la SHBG, però el vi negre amb un alt contingut en RSV augmentava significativament els nivells de la SHBG plasmàtica. Shufelt, *et al* (2012) van realitzar un estudi clínic amb un grup de dones pre-menopàusiques on comparaven els efectes del consum de vi blanc o de vi negre en diversos paràmetres plasmàtics i no van observar diferències en els nivells plasmàtics de la SHBG en cap dels grups analitzats [423]. Aquests resultats discrepen amb els observats al nostre estudi, on el vi negre ric en RSV augmenta significativament els nivells plasmàtics de la SHBG en dones. Existeix una diferència important entre el nostre estudi i el realitzat per Shufelt, *et al.* (2012) que podria explicar els resultats oposats



obtinguts. A l'estudi de Shufelt, *et al.* (2012) es va utilitzar un vi negre que contenia 0.9 mg/ml de RSV, concentració similar a la del vi negre amb baix contingut en RSV (1 mg/ml) utilitzat al nostre estudi i, en el qual tampoc s'observen diferències en els nivells plasmàtics de la SHBG després del seu consum, ni en homes ni en dones. En canvi, el consum del vi negre amb alt contingut en RSV (5.9 mg/ml) utilitzat al nostre estudi sí que augmenta significativament els nivells de la SHBG en dones. El vi negre amb un alt contingut en RSV conté sis vegades més RSV que l'utilitzat per Shufelt, *et al.* (2012), fet que podria explicar que és necessari un contingut major de RSV als vins negres per veure un efecte als nivells plasmàtics de la SHBG en dones.

A més, els resultats observats al nostre estudi pilot estan en concordança amb els resultats obtinguts en altres estudis previs amb suplementació de la dieta amb RSV. Chow *et al.* (2014) van observar un increment del 10% dels nivells plasmàtics de la SHBG després d'un tractament amb 1 g de RSV diari durant dotze setmanes a dones obesas post-menopàusiques [424]. En un altre estudi es van tractar a dones amb PCOS amb 1.5 g de RSV diari durant tres mesos i van observar un augment dels nivells plasmàtics de la SHBG, tot i que aquest no era significatiu [425]. Curiosament, l'increment de la SHBG és major al nostre estudi, en el qual les voluntàries rebien una dosi d'1.1 mg de RSV diari, dosi menor que la utilitzada a l'estudi de Chow *et al.* (2014). L'augment de l'efecte del RSV observat al nostre estudi pot ser explicat per diverses raons. Primer de tot, la baixa solubilitat que presenta el RSV pur i de la seva baixa absorció a nivell intestinal [426], en segon lloc per la presència d'altres polifenols al vi negre utilitzat al nostre estudi, com per exemple de diferents estilbens, que puguin estar incrementant els nivells plasmàtics de la SHBG en sinèrgia amb el RSV o que puguin estar donant estabilitat al RSV perquè s'absorbeixi més eficientment a nivell intestinal [427,428].

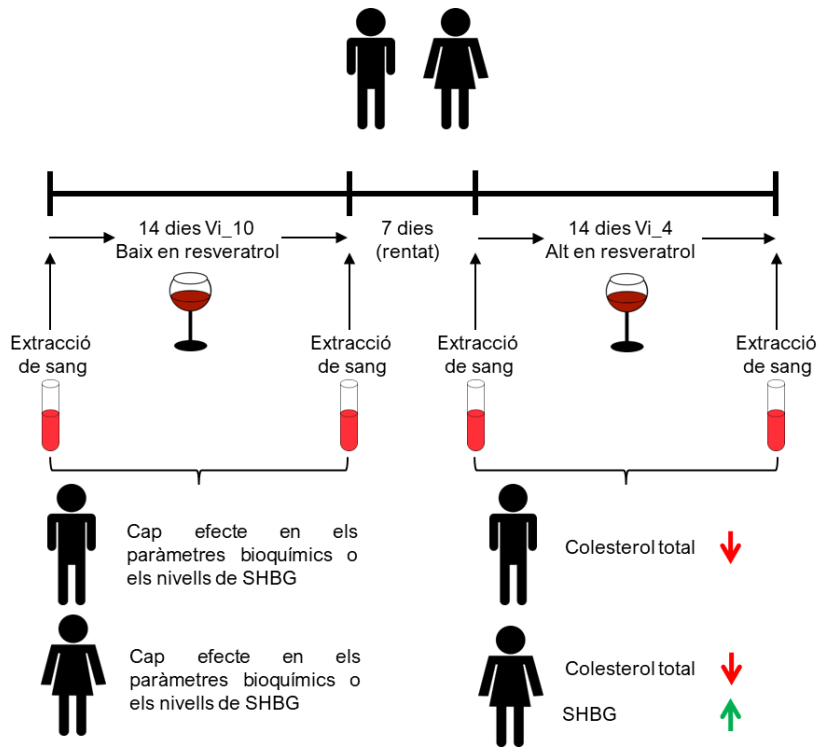
Pel que fa als homes, el consum de vi negre, tant el que conté una alta concentració en RSV com el que presenta un baix contingut en RSV, no modifica els nivells plasmàtics de la SHBG. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en un estudi previ realitzat a homes amb síndrome metabòlic, on el tractament diari de dosis entre 150 i 1000 mg de RSV durant quatre mesos no afectaven als

nivells plasmàtics de la SHBG [429]. Les diferències observades entre sexes en la modificació dels nivells plasmàtics de la SHBG provocades pel RSV son interessants i mereixen ser estudiades amb atenció, però aquesta diferència es podria explicar per les diferències d'expressió del CAR observades entre dones i homes [430,431], ja que està descrit que el RSV incrementa l'expressió hepàtica de la SHBG mitjançant l'activació del CAR humà [75].

El nostre estudi presenta diverses limitacions, com per exemple el baix nombre de participants, que només ens permet observar una possible relació entre el contingut de RSV dels vins negres i l'augment dels nivells plasmàtics de la SHBG en dones. Una altra limitació important del nostre estudi pilot és que al vi negre hi ha presència d'altres polifenols, com per exemple d'estilbens o d'altres antioxidants que, sinèrgicament amb el RSV, poden augmentar l'expressió hepàtica de la SHBG i aquests no han estat mesurats als vins negres utilitzats en aquest estudi.

En conclusió, l'estudi pilot mostra que el consum moderat de vi negre amb un alt contingut en RSV redueix els nivells plasmàtics de colesterol total, tant en dones com en homes, i incrementa els nivells plasmàtics de la SHBG només en dones (Figura 21). En canvi, el consum moderat de vi negre amb un baix contingut en RSV no modifica cap dels paràmetres bioquímics analitzats, ni en homes ni en dones.

Aquests resultats obren el camí a la realització d'estudis clínics amb més participants on es pugui determinar si el contingut en RSV dels vins negres i el seu efecte en els nivells plasmàtics de la SHBG poden ser els responsables dels beneficis cardiovasculars que s'atribueixen al consum moderat de vi negre.



**Figura 21:** El consum de vi negre ric en resveratrol augmenta els nivells plasmàtics de SHBG en dones i disminueix els nivells de colesterol total en homes i dones.

Estudi pilot amb vint-i-sis voluntaris sans (quinze homes i onze dones) els quals van beure durant catorze dies dos vins negres amb diferent contingut en resveratrol (RSV), amb una setmana de rentat entre el consum del vi negre amb baix contingut en RSV (1 mg/ml) i el vi negre amb un alt contingut en RSV (5.9 mg/ml). El consum del vi negre amb baix contingut en RSV no modifica els paràmetres bioquímics analitzats, en canvi, el consum del vi negre amb alt contingut en RSV disminueix els nivells totals de colesterol plasmàtics en homes i en dones i augmenta els nivells plasmàtics de la SHBG només en dones.

#### 4.3. Anàlisi de la regulació de la SHBG durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica i estudi dels mecanismes moleculars implicats

La prevalença de la NAFLD va en augment i actualment s'estima que entre un 14-25% de la població general mundial la pateix [209]. La NAFLD progressa d'esteatosi simple a NASH, on s'observa lesió cel·lular, inflamació i, en alguns casos, presència de fibrosi hepàtica, la qual és un factor clau de mal pronòstic de la malaltia, que pot desenvolupar cap a cirrosi i HCC [306]. Degut

a l'augment de la prevalença de la NAFLD i els riscos associats que comporta, l'estudi de biomarcadors que puguin predir el desenvolupament de la NAFLD ha esdevingut de gran importància durant els últims anys [307].

En humans, la SHBG plasmàtica es troba alterada en múltiples malalties metabòliques i diversos estudis mostren que els pacients amb NAFLD i NASH presenten nivells disminuïts de la SHBG [212–218]. En estudis previs realitzats al nostre laboratori s'han pogut determinar els mecanismes moleculars pels quals s'observa una disminució de la SHBG durant el primer estadi de la malaltia del fetge gras: l'esteatosi [121]. En aquest estadi, l'acumulació de greix al fetge augmenta l'expressió de PPAR $\gamma$  i disminueix els nivells d'HNF-4 $\alpha$ , en conseqüència, es disminueixen els nivells d'expressió hepàtica de la SHBG. En aquest sentit, està descrit que els nivells plasmàtics de la SHBG estan inversament correlacionats amb l'acumulació de greix hepàtic [432]. Tot i això, els mecanismes moleculars que regulen l'expressió hepàtica de la SHBG durant el desenvolupament d'estadis més avançats de la malaltia, com per exemple durant la fibrosi hepàtica, encara no havien estat determinats. Per aquest motiu, en aquest estudi s'ha analitzat la regulació hepàtica de la SHBG durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica i els mecanismes moleculars involucrats en aquesta regulació.

Per dur a terme aquest estudi s'ha utilitzat el ratolí transgènic per la *SHBG* humana i el model animal de dany hepàtic per administració de CCl $_4$ , àmpliament utilitzat per l'estudi de la fibrosi hepàtica [373–375]. Es va escollir el model animal de fibrosi hepàtica per administració de CCl $_4$  per tal d'observar el mecanisme molecular concret que regula l'expressió hepàtica de la SHBG durant el desenvolupament de la fibrosi. Aquest model animal no acumula greix al fetge i, per tant, es pot estudiar la regulació de la SHBG independentment de l'acumulació de greix, primer estadi de la NAFLD i on ja es coneixen els mecanismes moleculars que disminueixen l'expressió hepàtica de la SHBG durant aquesta etapa de la malaltia [121].

El tractament amb CCl $_4$  a ratolins transgènics per la *SHBG* humana no indueix acumulació de greix, però sí que augmenta la deposició de col·lagen i

incrementa l'expressió de *COL1A1* i de *TGFB1*, a nivell d'ARNm i de proteïna, tant en mascles com en femelles. L'augment de *COL1A1* és una característica de la fibrosi hepàtica [433] i el TGF- $\beta$ 1 és un dels factors de creixement claus que inicien el procés de fibrosis al fetge [361–363]. Diversos estudis previs ja han descrit que existeix un augment del TGF- $\beta$ 1 després del tractament amb  $\text{CCl}_4$  en ratolins [378,379,434], a més, aquest factor de creixement es troba augmentat als fetges dels pacients que pateixen fibrosi hepàtica [358,359], per tant, el model animal de fibrosi hepàtica per injecció de  $\text{CCl}_4$  és un bon model per l'estudi de la regulació de la SHBG durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica ja que presenta les característiques dels fetges humans amb fibrosi hepàtica.

En aquest estudi es va explorar si el TGF- $\beta$ 1 està implicat en la reducció dels nivells de la SHBG observats en pacients amb NASH i fibrosi hepàtica i es va determinar que el tractament amb TGF- $\beta$ 1 redueix els nivells d'expressió de la SHBG tant *in vitro* amb les cèl·lules HepG2, com *in vivo*, ja que el ratolí transgènic per la *SHBG* humana tractat amb TGF- $\beta$ 1 també presenta nivells disminuïts de SHBG. En aquest sentit, els ratolins transgènics per *SHBG* humana tractats amb  $\text{CCl}_4$ , els quals contenen nivells augmentats de TGF- $\beta$ 1, també presenten una reducció dels nivells de la SHBG hepàtica, si es comparen amb els que presenten els animals control (vehicle).

El TGF- $\beta$ 1 du a terme els seus efectes unint-se al seu receptor tipus II de TGF- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ RII), el qual es fosforila i forma un heterodímer amb el receptor tipus I de TGF- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ RI), que és transfosforilat i s'inicia la cascada de senyalització del TGF- $\beta$ 1 per la via canònica dels SMADs o per les vies no-canòniques, entre les quals s'hi troba la via del STAT3 [348,357,361]. Els resultats obtinguts *in vitro* corroboren que el tractament amb TGF- $\beta$ 1 redueix els nivells de SHBG a les cèl·lules HepG2 activant la fosforilació de les vies del SMAD3 i del STAT3, mitjançant el TGF $\beta$ RI. Aquesta reducció es pot revertir amb el cotractament amb SB-431542, un inhibidor de TGF $\beta$ RI [435,436].

Aquests resultats van ser parcialment confirmats *in vivo*, ja que el tractament amb TGF- $\beta$ 1 al ratolí transgènic per la *SHBG* humana incrementava la fosforilació del STAT3, però no es va detectar SMAD3 fosforilat als fetges dels

ratolins. Aquesta diferència entre els experiments *in vitro* i els experiments *in vivo* poden ser deguts a una diferència en el temps de resposta, ja que els animals van ser tractats una hora abans de ser sacrificats, podent haver desaparegut la fosforilació de pSMAD3 o per la pròpia afinitat de l'anticòs utilitzat i seria necessari un estudi més exhaustiu d'aquesta diferència observada.

La regió del promotor proximal de la SHBG al fetge ha estat àmpliament estudiada i diverses regions FP, on els factors de transcripció s'hi uneixen per regular la seva expressió, han estat identificades [44]. Concretament, a la regió del FP3 s'hi poden unir molts factors de transcripció, com l'HNF-4 $\alpha$  o PPAR $\gamma$  [73,105]. Per determinar si el TGF- $\beta$ 1 regula la transcripció gènica de la SHBG de forma directa es va analitzar *in silico* la regió de 299 pb del P<sub>L</sub> de la SHBG, el qual regula l'expressió hepàtica de la SHBG [73], però no es van identificar zones d'unió putatives ni del SMAD3 i ni del STAT3, factors que es torben augmentats després del tractament amb TGF- $\beta$ 1. A més, el tractament de TGF- $\beta$ 1 de curta durada (dues hores) a les cèl·lules HepG2 incrementava els nivells de pSMAD3 i pSTAT3, en canvi, no s'observava una disminució de l'expressió de la SHBG, suggerint un altre mecanisme molecular secundari implicat en la reducció dels nivells de la SHBG després del tractament amb TGF- $\beta$ 1.

Durant els últims anys, s'ha descobert que molts dels factors que regulen l'expressió de la SHBG hepàtica ho fan a través de modificar els nivells del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$ . Per exemple, diversos factors nutricionals, com una dieta rica en carbohidrats o el palmitat o diverses citocines, com el TNF- $\alpha$  o l'IL-1 $\beta$  disminueixen els nivells d'HNF-4 $\alpha$  [104,106,260], i conseqüentment, es redueixen els nivells de la SHBG. En canvi, les hormones tiroïdals o l'adiponectina augmenten els nivells d'HNF-4 $\alpha$  [105,108], amb un conseqüent augment dels nivells de la SHBG [73]. Per aquest motiu, es van analitzar els nivells dels dos factors de transcripció més importants que regulen la SHBG hepàtica i es va observar que el tractament amb TGF- $\beta$ 1 reduïa els nivells del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$ , en canvi, no s'observaven variacions en els nivells proteics de PPAR $\gamma$ , tant en els experiments *in vitro* amb les cèl·lules HepG2 com els experiment *in vivo* amb el ratolí transgènic per la SHBG humana. Aquests resultats també es van observar al model de fibrosi hepàtica per injecció de CCl<sub>4</sub>, ja que

els animals tractats amb CCl<sub>4</sub> presentaven nivells disminuïts del factor de transcripció HNF-4 $\alpha$ , comparats amb els nivells observats als ratolins control (vehicle), en canvi, el tractament amb CCl<sub>4</sub> no induïa diferències significatives als nivells proteics de PPAR $\gamma$ .

Concretament, amb els estudis *in vitro* amb les cèl·lules HepG2, es va determinar que el tractament amb TGF- $\beta$ 1 disminuïa específicament les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$  i incrementava les isoformes P2-HNF-4 $\alpha$ . Aquestes isoformes només es diferencien per la regió N-terminal, la qual conté el domini AF-1, una regió de transactivació [95]. Les isoformes P2-HNF-4 $\alpha$  no contenen aquest domini [94,96,97] i presenten un poder transcripcional menor que les isoformes canòniques P1-HNF-4 $\alpha$ , les qual si que presenten el domini AF-1 [94,98], a més, diversos gens diana d'HNF-4 $\alpha$  son dependents d'aquest domini [99]. Al nostre estudi es va confirmar que les isoformes P2-HNF-4 $\alpha$  tenen un poder transcripcional menor que les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$ , realitzant un estudi de luciferasa en cèl·lules HepG2, les HepG2 transfectades amb P2-HNF-4 $\alpha$  presentaven una activitat del promotor de la *SHBG* menor que les HepG2 transfectades amb P1-HNF-4 $\alpha$ .

A la literatura s'ha descrit que durant el desenvolupament de l'HCC existeix un augment de les isoformes P2-HNF-4 $\alpha$  i una disminució de les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$  [102,103], paral·lelament, en el desenvolupament d'HCC també s'observa un increment de TGF- $\beta$ 1 [361,437]. A més, un estudi recent amb pacients amb malaltia hepàtica alcohòlica mostra una desregulació en l'expressió de les diferents isoformes d'HNF-4 $\alpha$  en aquests pacients, els quals presenten un augment de les isoformes P2-HNF-4 $\alpha$  [438]. En aquest estudi, Argemi, *et al.* (2019) van determinar que el TGF- $\beta$ 1 era el factor responsable de l'augment de les isoformes P2-HNF-4 $\alpha$  observat en aquests pacients [438], resultats que es troben en concordança amb els obtinguts al nostre estudi.

Nivells elevats del TGF- $\beta$ 1 correlacionen amb un increment del risc de desenvolupar síndrome metabòlic, diabetis tipus 2 i malalties cardiovasculars [439], malalties que també han estat relacionades amb nivells plasmàtics disminuïts de la SHBG [202,416,432,440,441]. A més, la presència de fibrosi

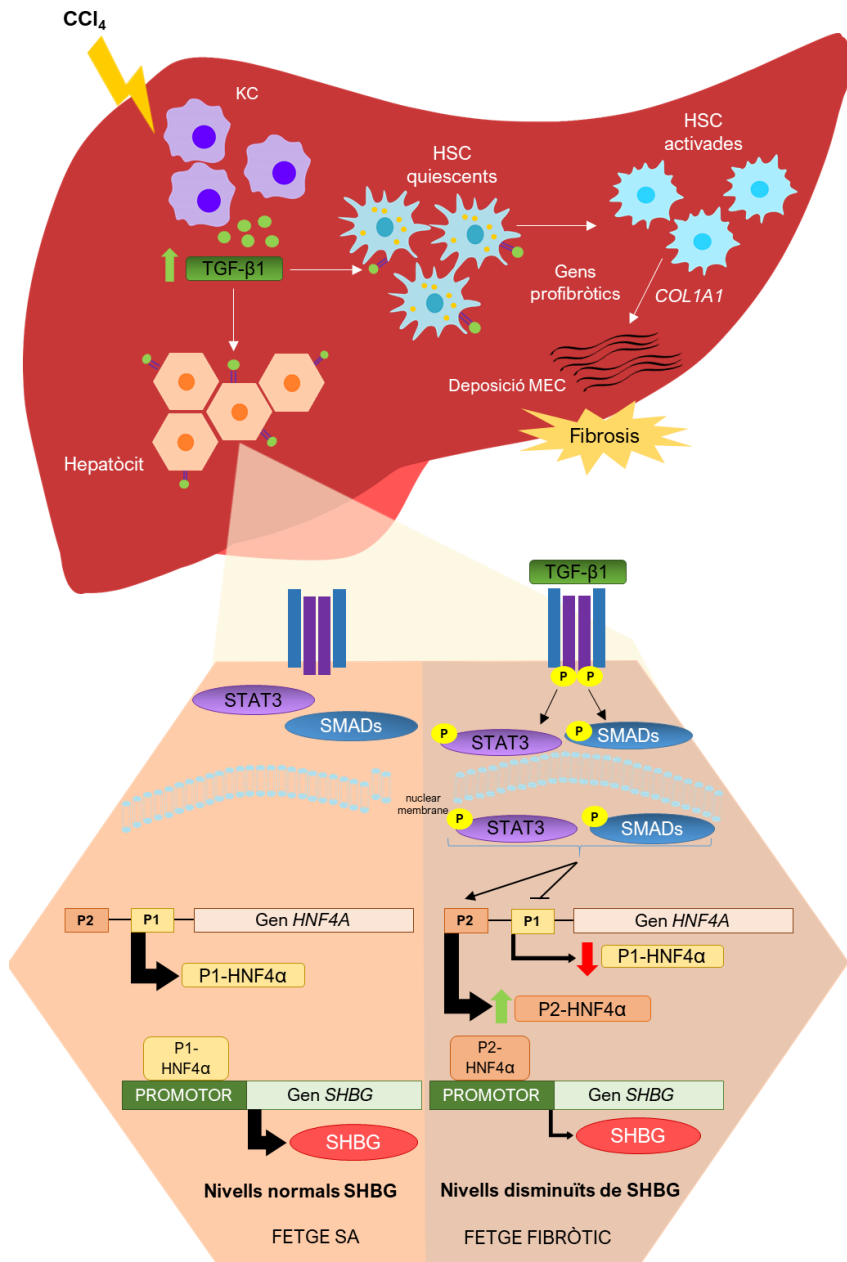
hepàtica és un factor de risc important pel desenvolupament de malalties CVD [442–444], per tant, la disminució dels nivells plasmàtics de la SHBG provocats pel TGF- $\beta$ 1 podrien explicar la relació observada entre nivells alterats del TGF- $\beta$ 1 i el risc a desenvolupar malalties com la DMT2 o les CVD. Per tant, la SHBG seria l'hepatoquina que uniria l'eix fetge-cor i la seva disminució durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica contribuiria al risc observat en pacients amb NAFLD/ NASH o amb fetges fibròtics o cirròtics de desenvolupar malalties CVD [304].

A la SHBG se li han atribuït efectes anti-inflamatoris [221], redueix l'acumulació de greix [219,220] i redueix l'estrès del reticle endoplasmàtic provocat pel palmitat en hepatòcits [297]. Tots aquests processos estan implicats en el desenvolupament de la NAFLD/NASH [307]. A més, citocines proinflamatòries com el TNF- $\alpha$  o l'IL-1 $\beta$  també redueixen la producció hepàtica de la SHBG [106,260] i aquestes citocines també estan involucrades en la inflamació present durant el desenvolupament de la NASH [346], per tant, durant el desenvolupament de la NASH, són diversos els factors que estarien implicats en la disminució dels nivells de la SHBG hepàtica, la qual presenta diversos efectes beneficiosos per frenar el desenvolupament d'aquesta malaltia. L'estudi de la possible implicació de la SHBG en el desenvolupament de la NASH i de la fibrosi hepàtica és interessant i s'hauria d'estudiar.

En resum, en aquest estudi s'ha determinat que durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica per dany hepàtic augmenta la producció del TGF- $\beta$ 1, el qual, mitjançant les vies de senyalització dels SMADs i de l'STAT3, disminueix els nivells de les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$  i augmenta els nivells de les isoformes P2-HNF-4 $\alpha$ , les quals presenten un poder transcripcional menor i desplacen a les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$  dels llocs d'unió del FP3 del promotor de la *SHBG*, disminuint així l'expressió hepàtica de la SHBG (**Figura 22**).

En conjunt, s'ha descrit per primera vegada al TGF- $\beta$ 1 com un factor que regula l'expressió hepàtica de la SHBG, el qual pot estar involucrat en la disminució dels nivells plasmàtics de la SHBG observats en pacients amb NAFLD/NASH.





**Figura 22:** Mecanisme molecular pel qual el TGF- $\beta$ 1 redueix els nivells d'expressió hepàtica de la SHBG. Durant el dany hepàtic induït pel  $\text{CCl}_4$  s'incrementa la producció del TGF- $\beta$ 1 per part de les cèl·lules de Kupffer (KC), entre altres. El TGF- $\beta$ 1 activa les cèl·lules estrellades (HSC), responsables de la producció de col·lagen tipus I i de la deposició de proteïnes fibril·lars a la matriu extracel·lular (MEC). Als hepatòcits, el TGF- $\beta$ 1 redueix els nivells de les isoformes P1-HNF-4 $\alpha$  i incrementa els nivells de les isoformes P2-HNF-4 $\alpha$  mitjançant les vies de senyalització dels SMAD i el STAT3, a través del receptor I del TGF- $\beta$ 1 receptor I, reduint d'aquesta manera els nivells d'expressió de la SHBG hepàtica.





# CONCLUSIONS



## 5. CONCLUSIONS

1. La cafeïna augmenta la producció hepàtica de la SHBG indirectament, augmentant l'expressió d'adiponectina al teixit adipós, mitjançant la via d'AKT/FOXO1. L'augment d'adiponectina incrementa els nivells d'HNF-4 $\alpha$  al fetge, augmentant l'expressió de SHBG.
2. El consum de vi negre amb un alt contingut en resveratrol disminueix el colesterol total en homes i dones i augmenta els nivells plasmàtics de la SHBG només en dones.
3. L'expressió de la SHBG es troba disminuïda durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica en el model animal de fibrosi hepàtica induïda pel CCl<sub>4</sub>.
4. La disminució de la SHBG observada durant el desenvolupament de la fibrosi hepàtica està provocada per un augment del TGF $\beta$ 1.
5. El mecanisme molecular pel qual el TGF $\beta$ 1 disminueix l'expressió de la SHBG es a través del TGF $\beta$ 1RI, incrementant la fosforilació dels SMADs i del STAT3, provocant una disminució de les isoformes P1-HNF4 $\alpha$  i un augment de l'expressió de les isoformes P2- HNF4 $\alpha$  al fetge.



# REFERÈNCIES





## 6. REFERÈNCIES

1. Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL *et al.* The Serum Transport of Steroid Hormones. *Recent Prog Horm Res* 1982;**38**:457–510.
2. Daughaday WH. Binding of corticosteroids by plasma proteins. IV. The electrophoretic demonstration of corticosteroid binding globulin. *J Clin Invest* 1958;**37**:519–23.
3. Mercier-Bodard C, Alfsen A, Baulieu EE. A testosterone binding globulin. *Proceedings of the Second Symposium on Steroid Hormones*. Ghent, 1965, 212.
4. Rosenbaum W, Christy NP, Kelly WG. Electrophoretic Evidence for the Presence of an Estrogen- Binding  $\beta$ -Globulin in Human Plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1966;**26**:1399–403.
5. Murphy BEP. Binding of testosterone and estradiol in plasma. *Can J Biochem* 1968;**46**:299–302.
6. Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: Binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;**53**:58–68.
7. Khan MS, Knowles BB, Aden DP *et al.* Secretion of testosterone-estradiol-binding globulin by a human hepatoma-derived cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;**53**:448–9.
8. Gershagen S, Lundwall Å, Fernlund P. Characterization of the human sex hormone binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis. *Nucleic Acids Res* 1989;**17**:9245–58.
9. Gershagen S, Fernlund P, Lundwall Å. A cDNA coding for human sex hormone binding globulin Homology to vitamin K-dependent protein S. *FEBS Lett* 1987;**220**:129–35.
10. Que BG, Petra PH. Characterization of a cDNA coding for sex steroid-binding protein of human plasma. *FEBS Lett* 1987;**219**:405–9.
11. Hammond GL, Underhill DA, Smith CL *et al.* The cDNA-deduced primary structure of human sex hormone-binding globulin and location of its steroid-binding domain. *FEBS Lett* 1987;**215**:100–4.
12. Hammond GL, Underbill DA, Rykse HM *et al.* The Human Sex Hormone-Binding Globulin Gene Contains Exons for Androgen-Binding Protein and Two Other Testicular Messenger RNAs. *Mol Endocrinol* 1989;**3**:1869–76.
13. French FS, Ritzfin EM. A high-affinity androgen-binding protein (abp) in rat testis: evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis. *Endocrinology* 1973;**93**:88–95.
14. Danzo BJ, Eller BC, Orgebin-Crist MC. Studies on the site of origin of the androgen binding protein present in epididymal cytosol from mature intact rabbits. *Steroids* 1974;**24**:107–22.
15. Fritz IB, Rommerts FG, Louis BG *et al.* Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of androgen binding protein in sertoli cell enriched cultures. *J Reprod Fertil* 1976;**46**:17–24.
16. Cheng CY, Musto NA, Gunsalus GL *et al.* There are two forms of androgen binding protein in human testes. Comparison of their protomeric variants with serum testosterone-estradiol binding globulin. *J Biol Chem* 1985;**260**:5631–40.

17. Cheng CY, Frick J, Gunsalus GL *et al.* Human Testicular Androgen-Binding Protein Shares Immunodeterminants with Serum Testosterone-Estradiol-Binding-Globulin. *Endocrinology* 1984;**114**:1395–401.
18. Cheng SL, Kotite N, Musto NA. Comparison of rabbit androgen binding protein with testosterone estradiol binding globulin-I. Physical and chemical properties. *J Steroid Biochem* 1984;**21**:669–76.
19. Kotite NJ, Su-Li C, Musto NA *et al.* Comparison of rabbit epididymal androgen binding protein and serum testosterone estradiol binding globulin-II. Immunological properties. *J Steroid Biochem* 1986;**25**:171–6.
20. Walsh KA, Titani K, Kumar S *et al.* Amino Acid Sequence of the Sex Steroid Binding Protein of Human Blood Plasma. *Biochemistry* 1986;**25**:7584–90.
21. Joseph DR, Hall SH, French FS. Rat androgen-binding protein: Evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone-binding globulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;**84**:339–43.
22. Joseph DR, Hall SH, Conti M *et al.* The gene structure of rat androgen-binding protein: Identification of potential regulatory deoxyribonucleic acid elements of a follicle-stimulating hormone-regulated protein. *Mol Endocrinol* 1988;**2**:3–13.
23. Sullivan PM, Petrusz P, Szpirer C *et al.* Alternative processing of androgen-binding protein RNA transcripts in fetal rat liver. Identification of a transcript formed by trans splicing. *J Biol Chem* 1991;**266**:143–54.
24. Joseph DR. Structure, Function, and Regulation of Androgen-Binding Protein/Sex Hormone-Binding Globulin. *Vitam Horm* 1994;**49**:197–280.
25. Wilson JD, Griffin JE, George FW. Sexual differentiation: Early hormone synthesis and action. *Biol Reprod* 1980;**22**:9–17.
26. Baker ME. Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates. *J Endocrinol* 2002;**175**:121–7.
27. Hammond GL. Plasma steroid-binding proteins: Primary gatekeepers of steroid hormone action. *J Endocrinol* 2016;**230**:R13–25.
28. Selby C. Sex hormone binding globulin: Origin, function and clinical significance. *Ann Clin Biochem* 1990;**27**:532–41.
29. Hammond GL. Access of reproductive steroids to target tissues. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002;**29**:411–23.
30. Avvakumov G V., Grishkovskaya I, Muller YA *et al.* Crystal structure of human sex hormone-binding globulin in complex with 2-methoxyestradiol reveals the molecular basis for high affinity interactions with C-2 derivatives of estradiol. *J Biol Chem* 2002;**277**:45219–25.
31. Avvakumov G V., Cherkasov A, Muller YA *et al.* Structural analyses of sex hormone-binding globulin reveal novel ligands and function. *Mol Cell Endocrinol* 2010;**316**:13–23.
32. De Leo V, Di Sabatino A, Musacchio MC *et al.* Effect of oral contraceptives on markers of hyperandrogenism and SHBG in women with polycystic ovary syndrome. *Contraception* 2010;**82**:276–80.
33. Xita N, Tsatsoulis A. Genetic variants of sex hormone-binding globulin and their biological consequences. *Mol Cell Endocrinol* 2010;**316**:60–5.

34. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**:3666–72.
35. Wu TS, Hammond GL. Naturally occurring mutants inform SHBG structure and function. *Mol Endocrinol* 2014;**28**:1026–38.
36. Mendel CM. The Free Hormone Hypothesis: A Physiologically Based Mathematical Model. *Endocr Rev* 1989;**10**:232–74.
37. Goldman AL, Bhasin S, Wu FCW *et al.* A reappraisal of testosterone's binding in circulation: Physiological and clinical implications. *Endocr Rev* 2017;**38**:302–24.
38. Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R *et al.* Role of Endocytosis in Cellular Uptake of Sex Steroids. *Cell* 2005;**122**:751–62.
39. Nagai J, Christensen EI, Morris SM *et al.* Mutually dependent localization of megalin and Dab2 in the renal proximal tubule. *Am J Physiol - Ren Physiol* 2005;**289**:569–76.
40. Gekle M. Renal tubule albumin transport. *Annu Rev Physiol* 2005;**67**:573–94.
41. Adam JS. “Bound” to Work: The Free Hormone Hypothesis Revisitedn. *Cell* 2005;**122**:547–8.
42. Laurent MR, Hammond GL, Blokland M *et al.* Sex hormone-binding globulin regulation of androgen bioactivity in vivo: Validation of the free hormone hypothesis. *Sci Rep* 2016;**6**:1–12.
43. Bérubé D, Séralini GE, Gagné R *et al.* Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12 --> p13). *Cytogenet Cell Genet* 1990;**54**:65–7.
44. Hammond GL. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biol Reprod* 2011;**85**:431–41.
45. Nakhla AM, Hryb DJ, Rosner W *et al.* Human sex hormone-binding globulin gene expression- multiple promoters and complex alternative splicing. *BMC Mol Biol* 2009;**10**.
46. Kahn SM, Hryb DJ, Nakhla AM *et al.* Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. *J Endocrinol* 2002;**175**:113–20.
47. Pinós T, Barbosa-Desongles A, Hurtado A *et al.* Identification, characterization and expression of novel Sex Hormone Binding Globulin alternative first exons in the human prostate. *BMC Mol Biol* 2009;**10**.
48. Simó R, Sáez-López C, Barbosa-Desongles A *et al.* Novel insights in SHBG regulation and clinical implications. *Trends Endocrinol Metab* 2015;**26**:376–83.
49. Corvol P, Bardin CW. Species Distribution of Testosterone-Binding Globulin. *Biol Reprod* 1973;**8**:277–82.
50. Bobe J, Guiguen Y, Fostier A. Diversity and biological significance of sex hormone-binding globulin in fish, an evolutionary perspective. *Mol Cell Endocrinol* 2010;**316**:66–78.
51. Selva DM, Hammond CL. Human sex hormone-binding globulin is expressed in testicular germ cells and not in sertoli cells. *Horm Metab Res* 2006;**38**:230–5.
52. Selva DM, Hogeveen KN, Hammond GL. Repression of the human sex hormone-binding globulin gene in sertoli cells by upstream stimulatory transcription factors. *J Biol Chem* 2005;**280**:4462–8.

53. Selva DM, Hogeveen KN, Seguchi K *et al.* A human sex hormone-binding globulin isoform accumulates in the acrosome during spermatogenesis. *J Biol Chem* 2002;**277**:45291–8.
54. Jänne M, Deol HK, Power SGA *et al.* Human sex hormone-binding globulin gene expression in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 1998;**12**:123–36.
55. Hryb DJ, Nakhla AM, Kahn SM *et al.* Sex hormone-binding globulin in the human prostate is locally synthesized and may act as an autocrine/paracrine effector. *J Biol Chem* 2002;**277**:26618–22.
56. Misao R, Itoh N, Mori H *et al.* Sex hormone-binding globulin mRNA levels in human uterine endometrium. *Eur J Endocrinol* 1994;**131**:623–9.
57. Misao R, Nakanishi Y, Fujimoto J *et al.* Expression of sex hormone-binding globulin mRNA in human ovarian cancers. *Eur J Educ Psychol* 1995;**133**:327–34.
58. Huang R, Ma Y, Holm R *et al.* Sex hormone-binding globulin (SHBG) expression in ovarian carcinomas and its clinicopathological associations. *PLoS One* 2013;**8**:1–8.
59. Forges T, Gérard A, Hess K *et al.* Expression of sex hormone-binding globulin (SHBG) in human granulosa-lutein cells. *Mol Cell Endocrinol* 2004;**219**:61–8.
60. Noé G. Sex hormone binding globulin expression and colocalization with estrogen receptor in the human Fallopian tube. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;**68**:111–7.
61. Larrea F, Díaz L, Cariño C *et al.* Evidence that human placenta is a site of Sex Hormone-Binding Globulin gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;**46**:497–505.
62. Moore KH, Bertram KA, Gomez RR *et al.* Sex hormone binding globulin mRNA in human breast cancer: Detection in cell lines and tumor samples. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;**59**:297–304.
63. Schock HW, Herbert Z, Sigusch H *et al.* Expression of androgen-binding protein (ABP) in human cardiac myocytes. *Horm Metab Res* 2006;**38**:225–9.
64. Balogh A, Karpati E, Schneider AE *et al.* Sex hormone-binding globulin provides a novel entry pathway for estradiol and influences subsequent signaling in lymphocytes via membrane receptor. *Sci Rep* 2019;**9**:1–15.
65. Fässler R, Schwarz S, Pohl P. Demonstration of Sex Hormone Binding Globulin in Human Cerebrospinal Fluid. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1985;**23**:349–59.
66. Hammond GL, Langley MS. Identification and measurement of sex hormone binding globulin (SHBG) and corticosteroid binding globulin (CBG) in human saliva. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986;**112**:603–8.
67. Bocchinfuso WP, Hammond GL. Structure/function analyses of human sex hormone-binding globulin by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* 1992;**301**:227–30.
68. Bocchinfuso W, Hammond GL. Steroid-Binding and Dimerization Domains of Human Sex Hormone-Binding Globulin Partially Overlap: Steroids and Ca<sup>2+</sup> Stabilize Dimer Formation. *Biochemistry* 1994;**33**:10622–9.
69. Sui L ming, Cheung AWC, Namkung PC *et al.* Localization of the steroid-binding site of the human sex steroid-binding protein of plasma (SBP or SHBG) by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* 1992;**310**:115–8.
70. Grishkovskaya I, Avvakumov G V., Sklenar G *et al.* Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: Steroid transport by a laminin G-like domain. *EMBO J* 2000;**19**:504–12.

71. Khan MS, Hryb DJ, Hashim GA *et al.* Delineation and synthesis of the membrane receptor-binding domain of sex hormone-binding globulin. *J Biol Chem* 1990;**265**:18362–5.
72. Petra PH, Zhang W, Griffin PR *et al.* Complete enzymatic deglycosylation of native sex steroid-binding protein (SBP or SHBG) of human and rabbit plasma: Effect on the steroid-binding activity. *Protein Sci* 1992;**1**:902–9.
73. Jänne M, Hammond GL. Hepatocyte nuclear factor-4 controls transcription from a TATA-less human sex hormone-binding globulin gene promoter. *J Biol Chem* 1998;**273**:34105–14.
74. Leng X, Cooney AJ, Tsai SY *et al.* Molecular mechanisms of COUP-TF-mediated transcriptional repression: evidence for transrepression and active repression. *Mol Cell Biol* 1996;**16**:2332–40.
75. Saez-Lopez C, Briansó-Llort L, Torres-Torrenteras J *et al.* Resveratrol Increases Hepatic SHBG Expression through Human Constitutive Androstane Receptor: A new Contribution to the French Paradox. *Sci Rep* 2017;**7**, DOI: 10.1038/s41598-017-12509-x.
76. Selva DM, Hammond GL. Peroxisome-proliferator receptor  $\gamma$  represses hepatic sex hormone-binding globulin expression. *Endocrinology* 2009;**150**:2183–9.
77. Hogeveen KN, Talikka M, Hammond GL. Human Sex Hormone-binding Globulin Promoter Activity Is Influenced by a (TAAAA)n Repeat Element within an Alu Sequence. *J Biol Chem* 2001;**276**:36383–90.
78. Selva DM, Bassas L, Munell F *et al.* Human sperm sex hormone-binding globulin isoform: Characterization and measurement by time-resolved fluorescence immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:6275–82.
79. Gunsalus GL, Larrea F, Musto NA *et al.* Androgen binding protein as a marker for sertoli cell function. *J Steroid Biochem* 1981;**15**:99–106.
80. Danzo BJ, Black J, Bell B. Analysis of the Oligosaccharides on Androgen-Binding proteins: implications concerning their role in structure/function relationships. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;**40**:821–31.
81. Joseph DR. Sequence and functional relationships between androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin and its homologs protein S, Gas6, laminin, and agrin. *Steroids* 1997;**62**:578–88.
82. Pugeat M, Nader N, Hogeveen K *et al.* Sex hormone-binding globulin gene expression in the liver: Drugs and the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2010;**316**:53–9.
83. Sladek FM, Zhong W, Lai E *et al.* Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 1990;**4**:2353–65.
84. Hayhurst GP, Lee Y-H, Lambert G *et al.* Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$  (Nuclear Receptor 2A1) Is Essential for Maintenance of Hepatic Gene Expression and Lipid Homeostasis. *Mol Cell Biol* 2001;**21**:1393–403.
85. Yuan X, Ta TC, Lin M *et al.* Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor. *PLoS One* 2009;**4**, DOI: 10.1371/journal.pone.0005609.
86. Fang B, Mane-Padros D, Bolotin E *et al.* Identification of a binding motif specific to HNF4 by comparative analysis of multiple nuclear receptors. *Nucleic Acids Res* 2012;**40**:5343–56.

87. Odom DT, Zizlsperger H, Gordon DB *et al.* Control of Pancreas and Liver Gene Expression by HNF Transcription Factors. *Science* (80- ) 2004;**303**:1378–81.
88. Bolotin E, Liao H, Ta TC *et al.* Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  target genes using protein binding microarrays. *Hepatology* 2010;**51**:642–53.
89. Wortham M, Czerwinski M, He L *et al.* Expression of constitutive androstane receptor, hepatic nuclear factor 4 $\alpha$ , and P450 oxidoreductase genes determines interindividual variability in basal expression and activity of a broad scope of xenobiotic metabolism genes in the human liver. *Drug Metab Dispos* 2007;**35**:1700–10.
90. Yin L, Ma H, Ge X *et al.* Hepatic Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$  Is Essential for Maintaining Triglyceride and Cholesterol Homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;**31**:328–36.
91. Chen WS, Manova K, Weinstein DC *et al.* Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev* 1994;**8**:2466–77.
92. Hata S, Tsukamoto T, Osumi T. A novel isoform of rat hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). *Biochim Biophys Acta* 1992;**1131**:211–3.
93. Hata S, Inoue T, Kosuga K *et al.* Identification of two splice isoforms of mRNA for mouse hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). *Biochim Biophys Acta* 1995;**1260**:55–61.
94. Lambert É, Babeu JP, Simoneau J *et al.* Human hepatocyte nuclear factor 4- $\alpha$  encodes isoforms with distinct transcriptional functions. *Mol Cell Proteomics* 2020;**19**:808–27.
95. Lavery DN, McEwan IJ. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: Induction of active conformations. *Biochem J* 2005;**391**:449–64.
96. Torres-Padilla ME, Sladek FM, Weiss MC. Developmentally regulated N-terminal variants of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  mediate multiple interactions through coactivator and corepressor-histone deacetylase complexes. *J Biol Chem* 2002;**277**:44677–87.
97. Torres-Padilla ME, Weiss MC. Effects of interactions of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  isoforms with coactivators and corepressors are promoter-specific. *FEBS Lett* 2003;**539**:19–23.
98. Eeckhoutte J, Moerman E, Bouckenooghe T *et al.* Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic  $\beta$ -cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms. *Endocrinology* 2003;**144**:1686–94.
99. Briançon N, Weiss MC. In vivo role of the HNF4 $\alpha$  AF-1 activation domain revealed by exon swapping. *EMBO J* 2006;**25**:1253–62.
100. Ko HL, Zhuo Z, Ren EC. HNF4 $\alpha$  Combinatorial Isoform Heterodimers Activate Distinct Gene Targets that Differ from Their Corresponding Homodimers. *Cell Rep* 2019;**26**:2549-2557.e3.
101. Dean S, Tang JI, Seckl JR *et al.* Developmental and tissue-specific regulation of hepatocyte nuclear factor 4- $\alpha$  (HNF4- $\alpha$ ) isoforms in rodents. *Gene Expr* 2010;**14**:337–44.
102. Tanaka T, Jiang S, Hotta H *et al.* Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  in the pathogenesis of human cancer. *J Pathol* 2006;**208**:662–72.

103. Cai SH, Lu SX, Liu LL *et al.* Increased expression of hepatocyte nuclear factor 4 alpha transcribed by promoter 2 indicates a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Therap Adv Gastroenterol* 2017;**10**:761–71.
104. Selva DM, Hogeveen KN, Innis SM *et al.* Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. *J Clin Invest* 2007;**117**:3979–87.
105. Selva DM, Hammond GL. Thyroid hormones act indirectly to increase sex hormone-binding globulin production by liver via hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ . *J Mol Endocrinol* 2009;**43**:19–27.
106. Simó R, Barbosa-Desongles A, Hernandez C *et al.* IL1 $\beta$  Down-regulation of Sex Hormone-Binding Globulin Production by Decreasing HNF-4 $\alpha$  Via MEK-1/2 and JNK MAPK Pathways. *Mol Endocrinol* 2012;**26**:1917–27.
107. Simó R, Barbosa-Desongles A, Lecube A *et al.* Potential role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in downregulating sex hormone-binding globulin. *Diabetes* 2012;**61**:372–82.
108. Simó R, Saez-Lopez C, Lecube A *et al.* Adiponectin upregulates SHBG production: Molecular mechanisms and potential implications. *Endocrinology* 2014;**155**:2820–30.
109. Silva AKS, Peixoto CA. Role of peroxisome proliferator-activated receptors in non-alcoholic fatty liver disease inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2018;**75**:2951–61.
110. Altmann R, Hausmann M, Spöttl T *et al.* 13-Oxo-ODE is an endogenous ligand for PPAR $\gamma$  in human colonic epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 2007;**74**:612–22.
111. Kwintkiewicz J, Nishi Y, Yanase T *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  mediates bisphenol A inhibition of FSH-stimulated IGF-1, aromatase, and estradiol in human granulosa cells. *Environ Health Perspect* 2010;**118**:400–6.
112. Chawla A, Lazar A. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)  $\gamma$ : Adipose-Predominant Expression and Induction Early in Adipocyte Differentiation. *Endocrinology* 1994;**135**:798–800.
113. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: The diverse biology of PPAR $\gamma$ . *Annu Rev Biochem* 2008;**77**:289–312.
114. Lee YK, Park JE, Lee M *et al.* Hepatic lipid homeostasis by peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *Liver Res* 2018;**2**:209–15.
115. Werman A, Hollenberg A, Solanes G *et al.* Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). Differential activity of PPAR $\gamma$ 1 and -2 isoforms and influence of insulin\*. *J Biol Chem* 1997;**272**:20230–5.
116. Vidal-Puig A, Jimenez-Liñan M, Lowell BB *et al.* Regulation of PPAR  $\gamma$  gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 1996;**97**:2553–61.
117. Yamazaki T, Shiraishi S, Kishimoto K *et al.* An increase in liver PPAR $\gamma$ 2 is an initial event to induce fatty liver in response to a diet high in butter: PPAR $\gamma$ 2 knockdown improves fatty liver induced by high-saturated fat. *J Nutr Biochem* 2011;**22**:543–53.
118. Zhang YL, Hernandez-Ono A, Siri P *et al.* Aberrant hepatic expression of PPAR $\gamma$ 2 stimulates hepatic lipogenesis in a mouse model of obesity, insulin resistance, dyslipidemia, and hepatic steatosis. *J Biol Chem* 2006;**281**:37603–15.
119. Morán-Salvador E, López-Parra M, García-Alonso V *et al.* Role for PPAR $\gamma$  in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J* 2011;**25**:2538–50.



120. Westerbacka J, Kolak M, Kiviluoto T *et al.* Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes* 2007;**56**:2759–65.
121. Saéz-López C, Rivera-Giménez M, Hernández C *et al.* SHBG-C57BL/ksJ-db/db: A new mouse model to study SHBG expression and regulation during obesity development. *Endocrinol (United States)* 2015;**156**:4571–81.
122. Polvani S, Pepe S, Milani S *et al.* COUP-TFII in health and disease. *Cells* 2020;**9**:1–30.
123. Wang LH, Ing NH, Tsai SY *et al.* The COUP-TFs compose a family of functionally related transcription factors. *Gene Expr* 1991;**1**:207–16.
124. Park JI, Tsai SY, Tsai MJ. Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J Med* 2003;**52**:174–81.
125. Cooney AJ, Leng X, Tsai SY *et al.* Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *J Biol Chem* 1993;**268**:4152–60.
126. Sikder HA, Devlin MK, Dunlap S *et al.* Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2003;**3**:525–30.
127. Sirito M, Walker S, Lin Q *et al.* Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers. *Gene Expr* 1992;**2**:231–40.
128. Vallet VS, Casado M, Henrion AA *et al.* Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose. *J Biol Chem* 1998;**273**:20175–9.
129. Rippe RA, Umezawa A, Kimball JP *et al.* Binding of upstream stimulatory factor to an E-box in the 3'-flanking region stimulates  $\alpha$ 1(I) collagen gene transcription. *J Biol Chem* 1997;**272**:1753–60.
130. Wang D, Sul HS. Upstream stimulatory factors bind to insulin response sequence of the fatty acid synthase promoter: USF1 is regulated. *J Biol Chem* 1995;**270**:28716–22.
131. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 2001;**29**:2905–19.
132. Porter W, Saville B, Hoivik D *et al.* Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1997;**11**:1569–80.
133. Couse JF, Curtis Hewitt S, Korach KS. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in reproductive tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;**74**:287–96.
134. Cooke PS, Heine PA, Taylor JA *et al.* The role of estrogen and estrogen receptor- $\alpha$  in male adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2001;**178**:147–54.
135. Mhyre AJ, Dorsa DM. Estrogen activates rapid signaling in the brain: Role of estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$  in neurons and glia. *Neuroscience* 2006;**138**:851–8.
136. Börjesson AE, Lagerquist MK, Windahl SH *et al.* The role of estrogen receptor  $\alpha$  in the regulation of bone and growth plate cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2013;**70**:4023–37.

137. Edmunds SEJ, Stubbs AP, Santos AA *et al.* Estrogen and androgen regulation of sex hormone binding globulin secretion by a human liver cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990;**37**:733–9.
138. Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B *et al.* Nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol* 2002;**62**:638–46.
139. Tolson AH, Wang H. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR☆. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;**62**:1238–49.
140. Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism and toxicology-with emphasis on cytochrome P450. *Toxicol Sci* 2011;**120**:1–13.
141. Yang H, Wang H. Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR). *Protein Cell* 2014;**5**:113–23.
142. Kachaylo EM, Yarushkin AA, Pustyl'nyak VO. Constitutive androstane receptor activation by 2,4,6-triphenyldioxane-1,3 suppresses the expression of the gluconeogenic genes. *Eur J Pharmacol* 2012;**679**:139–43.
143. Giguere V. Orphan nuclear receptors: From gene to function. *Endocr Rev* 1999;**20**:689–725.
144. Mäkinen J, Frank C, Jyrkkärinne J *et al.* Modulation of mouse and human phenobarbital-responsive enhancer module by nuclear receptors. *Mol Pharmacol* 2002;**62**:366–78.
145. Li H, Chen T, Cottrell J *et al.* Nuclear translocation of adenoviral-enhanced yellow fluorescent protein-tagged-human constitutive androstane receptor (hCAR): A novel tool for screening hcar activators in human primary hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2009;**37**:1098–106.
146. Miao J, Fang S, Bae Y *et al.* Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1 $\alpha$ . *J Biol Chem* 2006;**281**:14537–46.
147. Maglich JM, Parks DJ, Moore LB *et al.* Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *J Biol Chem* 2003;**278**:17277–83.
148. Handschin C. Induction of drug metabolism: Role for nuclear receptors. *Nucl Recept as Drug Targets* 2008;**39**:453–68.
149. Petra PH. The plasma sex steroid binding protein (SBP or SHBG). A critical review of recent developments on the structure, molecular biology and function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;**40**:735–53.
150. Hammond GL, Bocchinfuso WP. Sex Hormone-Binding Globulin: Gene Organization and Structure/Function Analyses. *Horm Res* 1996;**45**:197–201.
151. Avvakumov G V., Grishkovskaya I, Muller YA *et al.* Resolution of the Human Sex Hormone-binding Globulin Dimer Interface and Evidence for Two Steroid-binding Sites per Homodimer. *J Biol Chem* 2001;**276**:34453–7.
152. Hildebrand C, Bocchinfuso WP, Dales D *et al.* Resolution of the Steroid-Binding and Dimerization Domains of Human Sex Hormone-Binding Globulin by Expression in Escherichia Coli. *Biochemistry* 1995;**34**:3231–8.

153. Avvakumov G V., Muller YA, Hammond GL. Steroid-binding specificity of human sex hormone-binding globulin is influenced by occupancy of a zinc-binding site. *J Biol Chem* 2000;**275**:25920–5.
154. Grishkovskaya I, Avvakumov G V., Hammond GL *et al.* Steroid ligands bind human sex hormone-binding globulin in specific orientations and produce distinct changes in protein conformation. *J Biol Chem* 2002;**277**:32086–93.
155. Hong H, Branham WS, Ng HW *et al.* Human sex hormone-binding globulin binding affinities of 125 structurally diverse chemicals and comparison with their binding to androgen receptor, estrogen receptor, and  $\alpha$ -Fetoprotein. *Toxicol Sci* 2015;**143**:333–48.
156. Sui LM, Hughes W, Hoppe AJ *et al.* Direct evidence for the localization of the steroid-binding site of the plasma sex steroid-binding protein (SBP or SHBG) at the interface between the subunits. *Protein Sci* 1996;**5**:2514–20.
157. Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 2004;**73**:1019–49.
158. Yuan W, Benicky J, Wei R *et al.* Quantitative Analysis of Sex-Hormone-Binding Globulin Glycosylation in Liver Diseases by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Parallel Reaction Monitoring. *J Proteome Res* 2018;**17**:2755–66.
159. Avvakumov G V., Matveentseva I V., Akhrem L V. *et al.* Study of the carbohydrate moiety of human serum sex hormone-binding globulin. *BBA - Gen Subj* 1983;**760**:104–10.
160. Bocchinfuso WP, Warmels-Rodenhiser S, Hammond GL. Expression and differential glycosylation of human sex hormone-binding globulin by mammalian cell lines. *Mol Endocrinol* 1991;**5**:1723–9.
161. Cousin P, Déchaud H, Grenot C *et al.* Human variant sex hormone-binding globulin (SHBG) with an additional carbohydrate chain has a reduced clearance rate in rabbit. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:235–40.
162. Strel'chyonok OA, Avvakumov G V. Specific steroid-binding glycoproteins of human blood plasma: Novel data on their structure and function. *J Steroid Biochem* 1990;**35**:519–34.
163. Hammond GL, Robinson PA, Sugino H *et al.* Physicochemical characteristics of human sex hormone binding globulin: Evidence for two identical subunits. *J Steroid Biochem* 1986;**24**:815–24.
164. Westphal U. Sex Steroid-Binding Protein (SBP). *Steroid-Protein Interactions II*. Vol II. 1986, 198–301.
165. Becchis M, Sullivan PM, Ordronneau P *et al.* Distribution of immunoreactive androgen-binding protein / sex hormone- binding globulin in tissues of the fetal rat. *Steroids* 1996;**61**:392–400.
166. Majdic G, Saunders PTK, Teerds KJ. Immunoeexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17 $\alpha$ -hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of leydig cell steroid production is independ. *Biol Reprod* 1998;**58**:520–5.
167. Ng KM, So MT, Lee WM. Expression of rabbit sex hormone-binding globulin during pregnancy and prenatal development and identification of a novel isoform. *Endocrinology* 2005;**146**:1965–72.

168. Ha G. L., Leinonen P, Bolton NJ *et al.* Measurement of Sex Hormone Binding Globulin in Human Amniotic Fluid: Its Relationship To Protein and Testosterone Concentrations, and Fetal Sex. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1983;**18**:377–84.
169. Abramovich DR, Towler CM, Bohn H. The binding of sex steroids in human maternal and fetal blood at different stages of gestation. *J Steroid Biochem* 1978;**9**:791–4.
170. Anderson DC. Sex-Hormone-Binding Globulin. *Clin Endoc* 1974;**3**:69–96.
171. Hogeveen KN, Cousin P, Pugeat M *et al.* Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction. *J Clin Invest* 2002;**109**:973–81.
172. Belgorosky A, Rivarola MA. Progressive Increase in Nonsex Hormone-Binding Globulin-Bound Testosterone and Estradiol From Infancy to Late Prepuberty in Girls. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;**67**:234–7.
173. Leger J, Forest M, ne G. *et al.* Thyroid hormones influences sex steroid binding protein levels in infancy: Study in congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;**71**:1147–50.
174. Aydın B, Winters SJ. Sex hormone-binding globulin in children and adolescents. *JCRPE J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2016;**8**:1–12.
175. Belgorosky A, Rivarola MA. Progressive decrease in serum sex hormone-binding globulin from infancy to late prepuberty in boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;**63**:510–2.
176. Dewis P, Petsos P, Newman M *et al.* The Treatment of Hirsutism With a Combination of Desogestrel and Ethinyl Oestradiol. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1985;**22**:29–36.
177. Thaler MA, Seifert-Klauss V, Luppä PB. The biomarker sex hormone-binding globulin - From established applications to emerging trends in clinical medicine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015;**29**:749–60.
178. Cavaliere H, Abelin N, Medeiros-Neto G. Serum Levels of Total Testosterone and Sex Hormone Binding Globulin in Hypothyroid Patients and Normal Subjects Treated with Incremental Doses of L-T4 or L-T3. *J Androl* 1988;**9**:215–9.
179. Brenta G, Shnitman M, Gurfinkel M *et al.* Variations of Sex Thyroid Dysfunction Globulin in Thyroid Dysfunction. *Thyroid* 1999;**9**:2–6.
180. Sarne DH, Refetoff S, Rosenfield RL *et al.* Sex hormone-binding globulin in the diagnosis of peripheral tissue resistance to thyroid hormone: The value of changes after short term triiodothyronine administration. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;**66**:740–6.
181. Ragatt LE, Blok RB, Shane HP *et al.* Effects of Thyroid Hormone on Sex Hormone-Binding Globulin Gene Expression in Human Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;**75**:116–20.
182. Glass AR, Swerdloff RS, Bray GA *et al.* Low serum testosterone and sex-hormone-binding-globulin in massively obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;**45**:1211–9.
183. Niskanen L, Laaksonen DE, Punnonen K *et al.* Changes in sex hormone-binding globulin and testosterone during weight loss and weight maintenance in abdominally obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes, Obes Metab* 2004;**6**:208–15.
184. Telgenkamp I, Kusters YHAM, Schalkwijk CG *et al.* Contribution of Liver Fat to Weight Loss-Induced Changes in Serum Hepatokines: A Randomized Controlled Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;**104**:2719–27.

185. Barbe P, Bennet A, Stebenet M *et al.* Sex-hormone-binding globulin and protein-energy malnutrition indexes as indicators of nutritional status in women with anorexia nervosa. *Am J Clin Nutr* 1993;**57**:319–22.
186. Kavanagh K, Espeland MA, Sutton-Tyrrell K *et al.* Liver fat and SHBG affect insulin resistance in midlife women: The Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Obesity* 2013;**21**:1031–8.
187. Sáez-López C, Salcedo-Allende MT, Hernandez C *et al.* Sex hormone-binding globulin expression correlates with acetyl-coenzyme a carboxylase and triglyceride content in human liver. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;**104**:1500–7.
188. Eckel RH, Alberti KGMM, Grundy SM *et al.* The metabolic syndrome. *Lancet* 2010;**375**:181–3.
189. Astrup A, Finer N. Redefining type 2 diabetes: “Diabesity” or “obesity dependent diabetes mellitus”? *Obes Rev* 2000;**1**:57–9.
190. Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;**414**:782–7.
191. Ortega MA, Fraile-Martínez O, Naya I *et al.* Type 2 diabetes mellitus associated with obesity (Diabesity). The central role of gut microbiota and its translational applications. *Nutrients* 2020;**12**:1–29.
192. Haffner SM. The metabolic syndrome: Inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006;**97**:3–11.
193. Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K *et al.* Testosterone and Sex Hormone-Binding Globulin Predict the Metabolic Syndrome and Diabetes in Middle-Aged Men. *Diabetes Care* 2004;**27**:1036–41.
194. Li C, Ford ES, Li B *et al.* Association of Testosterone and Sex Hormone – Binding Globulin With Metabolic. *Diabetes Care* 2010;**33**, DOI: 10.2337/dc09-1788.The.
195. Sirtan CR, Group AW, Investigators A *et al.* Diet and Risk of Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2002;**346**:297–8.
196. Mohammed M, Al-Habori M, Abdullateef A *et al.* Impact of Metabolic Syndrome Factors on Testosterone and SHBG in Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome. *J Diabetes Res* 2018;**2018**, DOI: 10.1155/2018/4926789.
197. Siddiqui K, Al-Rubeaan K, Nawaz SS *et al.* Serum Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) Relation with Different Components of Metabolic Syndrome in Men with Type 2 Diabetes. *Horm Metab Res* 2018;**50**:138–44.
198. Ding EL, Song Y, Manson JE *et al.* Sex Hormone–Binding Globulin and Risk of Type 2 Diabetes in Women and Men. *N Engl J Med* 2009;**361**:1152–63.
199. Perry JRB, Weedon MN, Langenberg C *et al.* Genetic evidence that raised sex hormone binding globulin (SHBG) levels reduce the risk of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet* 2009;**19**:535–44.
200. Le TN, Nestler JE, Strauss JF *et al.* Sex hormone-binding globulin and type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2012;**23**:32–40.
201. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chirubuk SE *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2017;**135**:e146–603.

202. Sutton-Tyrrell K, Wildman RP, Matthews KA *et al.* Sex hormone-binding globulin and the free androgen index are related to cardiovascular risk factors in multiethnic premenopausal and perimenopausal women enrolled in the study of women across the nation (SWAN). *Circulation* 2005;**111**:1242–9.
203. Haffner SM, Katz MS, Stern MP *et al.* Association of decreased sex hormone binding globulin and cardiovascular risk factors. *Arteriosclerosis* 1989;**9**:136–43.
204. Canoy D, Barber TM, Pouta A *et al.* Serum sex hormone-binding globulin and testosterone in relation to cardiovascular disease risk factors in young men: A population-based study. *Eur J Endocrinol* 2014;**170**:863–72.
205. Firtser S, Juonala M, Magnussen CG *et al.* Relation of total and free testosterone and sex hormone-binding globulin with cardiovascular risk factors in men aged 24–45 years. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis* 2012;**222**:257–62.
206. Kalme T, Seppälä M, Qiao Q *et al.* Sex hormone-binding globulin and insulin-like growth factor-binding protein-1 as indicators of metabolic syndrome, cardiovascular risk, and mortality in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:1550–6.
207. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: Pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2010;**5**:145–71.
208. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;**34**:274–85.
209. Lucas C, Lucas G, Lucas N *et al.* A systematic review of the present and future of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Hepatol* 2018;**4**:165–74.
210. Stojsavljević S, Gomerčić Palčić M, Virović Jukić L *et al.* Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;**20**:18070–91.
211. Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem. *Clin Med (Northfield Il)* 2011;**11**:176–8.
212. Jaruvongvanich V, Sanguankeo A, Riangwiwat T *et al.* Testosterone, Sex Hormone-Binding Globulin and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Hepatol* 2017;**16**:382–94.
213. Lazo M, Zeb I, Nasir K *et al.* Association Between Endogenous Sex Hormones and Liver Fat in a Multiethnic Study of Atherosclerosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;**13**:1686–1693.e2.
214. Mueller NT, Liu T, Mitchel EB *et al.* Sex Hormone Relations to Histologic Severity of Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;**105**:3496–504.
215. Wang N, Zhai H, Zhu C *et al.* Combined association of vitamin d and sex hormone binding globulin with nonalcoholic fatty liver disease in men and postmenopausal women: A cross-sectional study. *Med (United States)* 2016;**95**:1–10.
216. Wang X, Xie J, Pang J *et al.* Serum SHBG Is Associated With the Development and Regression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Prospective Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;**105**, DOI: 10.1210/clinem/dgz244.

217. Sarkar M, VanWagner LB, Terry JG *et al.* Sex Hormone-Binding Globulin Levels in Young Men Are Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Midlife. *Am J Gastroenterol* 2019;**114**:758–63.
218. Shin JY, Kim SK, Lee MY *et al.* Serum sex hormone-binding globulin levels are independently associated with nonalcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;**94**:156–62.
219. Saez-Lopez C, Barbosa-Desongles A, Hernandez C *et al.* Sex hormone-binding globulin reduction in metabolic disorders may play a role in NAFLD development. *Endocrinol (United States)* 2017;**158**:545–59.
220. Saez-Lopez C, Villena JA, Simó R *et al.* Sex hormone-binding globulin overexpression protects against high-fat diet-induced obesity in transgenic male mice. *J Nutr Biochem* 2020;**85**:108480.
221. Yamazaki H, Kushiyama A, Sakoda H *et al.* Protective effect of sex hormone-binding globulin against metabolic syndrome: in vitro evidence showing anti-inflammatory and lipolytic effects on adipocytes and macrophages. *Mediators Inflamm* 2018:3062319.
222. Deswal R, Narwal V, Dang A *et al.* The Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Systematic Review. *J Hum Reprod Sci* 2020;**13**:261–71.
223. Hoeger KM, Dokras A, Piltonen T. Update on PCOS: Consequences, Challenges, and Guiding Treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2021;**106**:E1071–83.
224. Moghetti P, Tosi F. Insulin resistance and PCOS: chicken or egg? *J Endocrinol Invest* 2021;**44**:233–44.
225. Simons PIHG, Valkenburg O, Bons JAP *et al.* The relationships of sex hormone-binding globulin, total testosterone, androstenedione and free testosterone with metabolic and reproductive features of polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Diabetes Metab* 2021;**4**:1–10.
226. Qu X, Donnelly R. Sex hormone-binding globulin (Shbg) as an early biomarker and therapeutic target in polycystic ovary syndrome. *Int J Mol Sci* 2020;**21**:1–17.
227. Di Stasi V, Maseroli E, Rastrelli G *et al.* SHBG as a Marker of NAFLD and Metabolic Impairments in Women Referred for Oligomenorrhea and/or Hirsutism and in Women With Sexual Dysfunction. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;**12**, DOI: 10.3389/fendo.2021.641446.
228. Li Y, Fang L, Yan Y *et al.* Association between human SHBG gene polymorphisms and risk of PCOS: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2021;**42**:227–36.
229. Abu-Hijleh TM, Gammoh E, Al-Busaidi AS *et al.* Common Variants in the Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) Gene Influence SHBG Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Ann Nutr Metab* 2016;**68**:66–74.
230. Bhatnager R, Senwal A, Nanda S *et al.* Association of rs6259 polymorphism with SHBG levels and Poly Cystic Ovary Syndrome in Indian population: a case control study. *Mol Biol Rep* 2019;**46**:2131–8.
231. Hammond GL, Wu TS, Simard M. Evolving utility of sex hormone-binding globulin measurements in clinical medicine. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012;**19**:183–9.
232. Vanbillemont G, Bogaert V, De Bacquer D *et al.* Polymorphisms of the SHBG gene contribute to the interindividual variation of sex steroid hormone blood levels in young, middle-aged and elderly men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;**70**:303–10.

233. Power SGA, Bocchinfuso WP, Pallesen M *et al.* Molecular Analysis of a Human Sex Hormone-Binding Globulin Variant: Evidence for an Additional Carbohydrate Chain. *J Endocrinol Metab* 1992;**75**:1066–70.
234. Cui Y, Shu X-O, Cai Q *et al.* Association of endometrial cancer risk with a functional polymorphism (Asp327Asn) in the sex hormone-binding globulin gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;**14**:1096–101.
235. Ohlsson C, Wallaschofski H, Lunetta KL *et al.* Genetic determinants of serum testosterone concentrations in men. *PLoS Genet* 2011;**7**, DOI: 10.1371/journal.pgen.1002313.
236. Svartberg J, Schirmer H, Wilsgaard T *et al.* Single-nucleotide polymorphism, rs1799941 in the Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) gene, related to both serum testosterone and SHBG levels and the risk of myocardial infarction, type 2 diabetes, cancer and mortality in men: The Tromsø Study. *Andrology* 2014;**2**:212–8.
237. White MJ, Eren F, Agirbasli D *et al.* SHBG gene polymorphism (rs1799941) associates with metabolic syndrome in children and adolescents. *PLoS One* 2015;**10**:1–15.
238. Pang XN, Yuan Y, Sun Y *et al.* The relationship of sex hormone-binding globulin (SHBG) gene polymorphisms with serum SHBG level and metabolic syndrome in Chinese Han males. *Aging Clin Exp Res* 2014;**26**:583–9.
239. Becchis M, Frairia R, Ferrera P *et al.* The additionally glycosylated variant of human sex hormone-binding globulin (SHBG) is linked to estrogen-dependence of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1999;**54**:101–7.
240. Thompson DJ, Healey CS, Baynes C *et al.* Identification of common variants in the SHBG gene affecting sex hormone-binding globulin levels and breast cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;**17**:3490–8.
241. Haiman CA, Riley SE, Freedman ML *et al.* Common genetic variation in the sex Steroid Hormone-Binding Globulin (SHBG) gene and circulating SHBG levels among postmenopausal women: The multiethnic cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:2198–204.
242. Cousin P, Calemard-Michel L, Lejeune H *et al.* Influence of SHBG Gene Pentanucleotide TAAAA Repeat and D327N Polymorphism on Serum Sex Hormone-Binding Globulin Concentration in Hirsute Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;**89**:917–24.
243. Archer DF, Thomas MA, Conard J *et al.* Impact on hepatic estrogen-sensitive proteins by a 1-year contraceptive vaginal ring delivering Nestorone® and ethinyl estradiol. *Contraception* 2016;**93**:58–64.
244. Jung-Hoffman C, Storch A, Kuhl H. Serum Concentrations of Ethinylestradiol, 3-Keto-Desogestrel, SHBG, CBG and Gonadotropins during Treatment with Biphasic Oral Contraceptive Containing Desogestrel. *Horm Res* 1992;**38**:184–9.
245. Leo V De, Sabatino A Di, Musacchio MC *et al.* Effect of oral contraceptives on markers of hyperandrogenism and SHBG in women with polycystic ovary syndrome. *Contraception* 2010;**82**:276–80.
246. van Kammen E, Thijssen J, Rademaker B *et al.* The Influence of Hormonal Contraceptives on Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) capacity. *Contraception* 1975;**11**:53–9.
247. Mercier-Bodard C, Baulieu EE. Hormonal Control of SBP in Human Hepatoma Cells. *J Steroid Biochem* 1986;**24**:443–8.



248. Lee IR, Dawson SA, Wetherall JD *et al.* Sex Hormone-Binding Globulin Secretion by Human Hepatocarcinoma Cells is Increased by Both Estrogens and Androgens. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;**64**:825–31.
249. Plymate SR, Matej LA, Jones RE *et al.* Inhibition of Sex Hormone-Binding Globulin Production in the Human Hepatoma (HepG2) Cell Line by Insulin and Prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;**67**:460–4.
250. Loukovaara M, Carson M, Adlercreutz H. Regulation of Production and Secretion of Sex Hormone-Binding Globulin in HepG2 Cell Cultures by Hormones and Growth Factors. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;**80**:1–5.
251. Kalme T, Loukovaara M, Koistinen R *et al.* Estradiol increases the production of sex hormone-binding globulin but not insulin-like growth factor binding protein-1 in cultured human hepatoma cells. *Fertil Steril* 1999;**72**:325–9.
252. Odland V, Elamsson K, Victor A *et al.* Effects of oestradiol on sex hormone binding globulin. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1982;**101**:284–253.
253. Jia MC, Zhou LY, Ren S *et al.* Serum SHBG levels during normal menstrual cycle and after insertion of levonorgestrel-releasing IUD. *Adv Contracept* 1992;**8**:33–40.
254. Rosner W, Aden DP, Khan MS. Hormonal Influences on the Secretion of Steroid-Binding Proteins by Human Hepatoma-Derived Cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;**59**:806–8.
255. Plymate SR, Jones RE, Friedl KE. Regulation of Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) production in HepG2 cells by Insulin. *Steroids* 1988;**52**:339–40.
256. Ouchi N, Parker JL, Lugus J *et al.* Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011;**11**:85–97.
257. Yasui T, Tomita J, Miyatani Y *et al.* Associations of adiponectin with sex hormone-binding globulin levels in aging male and female populations. *Clin Chim Acta* 2007;**386**:69–75.
258. Gannagé-Yared MH, Khalife S, Semaan M *et al.* Serum adiponectin and leptin levels in relation to the metabolic syndrome, androgenic profile and somatotrophic axis in healthy non-diabetic elderly men. *Eur J Endocrinol* 2006;**155**:167–76.
259. Ramon-Krauel M, Leal-Witt MJ, Osorio-Conles O *et al.* Relationship between adiponectin, TNF $\alpha$  and SHBG in prepubertal children with obesity. *Endocr Abstr* 2021;**8**:4–9.
260. Simó R, Barbosa-Desongles A, Sáez-Lopez C *et al.* Molecular mechanism of TNF $\alpha$ -induced down-regulation of SHBG expression. *Mol Endocrinol* 2012;**26**:438–46.
261. Longcope C, Feldman HA, McKinlay JB *et al.* Diet and sex hormone-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:293–6.
262. Berrino F, Bellati C, Secreto G *et al.* Reducing bioavailable sex hormones through a comprehensive change in diet: The diet and androgens (DIANA) randomized trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;**10**:25–33.
263. Goldin B, Woods M, Spiegelman D *et al.* The effect of dietary fat and fiber on serum estrogen concentrations in premenopausal women under controlled dietary conditions. *Cancer* 1994;**1**:1125–31.
264. Key TJA, Roe L, Thorogood M *et al.* Testosterone, sex hormone-binding globulin, calculated free testosterone, and oestradiol in male vegans and omnivores. *Br J Nutr* 1990;**64**:111–9.

265. Reed M, Cheng R, Simmonds M *et al*. DIETARY LIPIDS: AN ADDITIONAL REGULATOR OF PLASMA LEVELS OF SEX HORMONE BINDING GLOBULIN. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;**64**:1083–5.
266. Boulin K, Robitaille J, Bélanger C *et al*. Effect of a Six-Week National Cholesterol Education Program Step 1 Diet on Plasma Sex Hormone-Binding Globulin Levels In Overweight Premenopausal Women. *Metab Syndr Relat Disord* 2007;**5**:22–33.
267. López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E *et al*. Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;**20**:284–94.
268. Owen RW, Mier W, Giacosa A *et al*. Phenolic compounds and squalene in olive oils: The concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol* 2000;**38**:647–59.
269. Sáez-López C, Soriguer F, Hernandez C *et al*. Oleic acid increases hepatic sex hormone binding globulin production in men. *Mol Nutr Food Res* 2014;**58**:760–7.
270. Visioli F, Galli C. Antiatherogenic components of olive oil. *Curr Atheroscler Rep* 2001;**3**:64–7.
271. Song W, Wang HJ, Bucheli P *et al*. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *J Agric Food Chem* 2009;**57**:9133–40.
272. Wang Y, Catana F, Yang Y *et al*. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *J Agric Food Chem* 2002;**50**:431–5.
273. Frémont L. Biological Effects of Resveratrol. *Life Sci* 2000;**66**:663–73.
274. Alberdi G, Rodríguez VM, Macarulla MT *et al*. Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet. *Nutrition* 2013;**29**:562–7.
275. Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle* 2008;**7**:1020–35.
276. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006;**5**:493–506.
277. Xia N, Daiber A, Förstermann U *et al*. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2017;**174**:1633–46.
278. Pangen R, Sahni JK, Ali J *et al*. Resveratrol: Review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2014;**11**:1285–98.
279. Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis* 2001;**156**:67–72.
280. van Dam RM, Hu FB, Willett WC. Coffee, Caffeine, and Health. *N Engl J Med* 2020;**383**:369–78.
281. Ludwig IA, Clifford MN, Lean MEJ *et al*. Coffee: Biochemistry and potential impact on health. *Food Funct* 2014;**5**:1695–717.
282. Murakami K, Okubo H, Sasaki S. Effect of Dietary Factors on Incidence of Type 2 Diabetes: A Systematic Review of Cohort Studies. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2005;**51**:292–310.
283. Van Dam RM. Coffee and type 2 diabetes: From beans to beta-cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;**16**:69–77.

284. Huxley R, Lee CMY, Barzi F *et al.* Coffee, decaffeinated coffee, and tea consumption in relation to incident type 2 diabetes mellitus: A systematic review with meta-analysis. *Arch Intern Med* 2009;**169**:2053–63.
285. Kotosopoulos J, Eliassen AH, Mismmer SA *et al.* Relationship Between Caffeine Intake and Plasma Sex Hormone Concentrations in Premenopausal and Postmenopausal Women. *Cancer* 2009;**115**:2765–74.
286. Goto A, Song Y, Chen BH *et al.* Coffee and caffeine consumption in relation to sex hormone-binding globulin and risk of type 2 diabetes in postmenopausal women. *Diabetes* 2011;**60**:269–75.
287. London S, Willett W, Longcope C *et al.* Alcohol and other dietary factors in relation to serum hormone concentrations in women at climacteric. *Am J Clin Nutr* 1991;**53**:166–71.
288. Nagata C, Kabuto M, Shimizu H. Association of coffee, green tea, and caffeine intakes with serum concentrations of estradiol and sex hormone-binding globulin in premenopausal Japanese women. *Nutr Cancer* 1998;**30**:21–4.
289. Ferrini RL, Barrett-Connor E. Caffeine intake and endogenous sex steroid levels in postmenopausal women: The Rancho Bernardo study. *Am J Epidemiol* 1996;**144**:642–4.
290. Frey T, Platz EA, Kanarek N *et al.* Consumption of caffeinated beverages and serum concentrations of sex steroid hormones in US men. *Cancer Causes Control* 2018;**29**:157–66.
291. Hang D, Kværner AS, Ma W *et al.* Coffee consumption and plasma biomarkers of metabolic and inflammatory pathways in US health professionals. *Am J Clin Nutr* 2019;**109**:586–96.
292. Pihan-Le Bars F, Gusto G, Boutron-Ruault M-C *et al.* Cross-sectional association of coffee and caffeine consumption with sex hormone-binding globulin in healthy nondiabetic women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2017;**87**:475–83.
293. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA *et al.* Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996;**84**:491–5.
294. Katsuda Y, Ohta T, Shinohara M *et al.* Diabetic mouse models. *Open J Anim Sci* 2013;**03**:334–42.
295. Del Mar Gonzalez-Barroso M, Ricquier D, Cassard-Doulier AM. The human uncoupling protein-1 gene (UCP1): Present status and perspectives in obesity research. *Obes Rev* 2000;**1**:61–72.
296. Cao W, Daniel KW, Robidoux J *et al.* p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is the Central Regulator of Cyclic AMP-Dependent Transcription of the Brown Fat Uncoupling Protein 1 Gene. *Mol Cell Biol* 2004;**24**:3057–67.
297. Kornicka-Garbowska K, Bourebaba L, Röcken M *et al.* Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) Mitigates ER Stress in Hepatocytes In Vitro and Ex Vivo. *Cells* 2021;**10**:1–20.
298. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;**64**:73–84.
299. Angulo P. Non Alcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med* 2002;**346**:1221–31.

300. Gholam PM, Flancbaum L, MacHan JT *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects. *Am J Gastroenterol* 2007;**102**:399–408.
301. Tilg H, Adolph TE, Moschen AR. Multiple Parallel Hits Hypothesis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Revisited After a Decade. *Hepatology* 2021;**73**:833–42.
302. Alisi A, Feldstein AE, Villani A *et al.* Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: A multidisciplinary approach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;**9**:152–61.
303. Tilg H, Moschen AR, Roden M. NAFLD and diabetes mellitus. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;**14**:32–42.
304. Adams LA, Anstee QM, Tilg H *et al.* Non-Alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases. *Gut* 2017;**66**:1138–53.
305. Loomba R, Lim JK, Patton H *et al.* AGA Clinical Practice Update on Screening and Surveillance for Hepatocellular Carcinoma in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Expert Review. *Gastroenterology* 2020;**158**:1822–30.
306. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P *et al.* Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* 2015;**61**:1547–54.
307. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M *et al.* *Mechanisms of NAFLD Development and Therapeutic Strategies.*, 2018.
308. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AMS *et al.* Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009;**51**:371–9.
309. Fujii H, Kawada N. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2012;**47**:215–25.
310. Yu A. Elevated AST or ALT to nonalcoholic fatty liver disease: accurate predictor of disease prevalence? *Am J Gastroenterol* 2003;**98**:955–6.
311. Tapper EB, Loomba R. Noninvasive imaging biomarker assessment of liver fibrosis by elastography in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;**15**:274–82.
312. Brunt EM, Janney CG, Bisceglie AM Di *et al.* Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions Elizabeth. *Am J Gastroenterol* 1999;**94**:2467–74.
313. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;**41**:1313–21.
314. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2010;**16**:5286–96.
315. Chowdhury AB, Mehta KJ. Liver biopsy for assessment of chronic liver diseases: a synopsis. *Clin Exp Med* 2022, DOI: 10.1007/s10238-022-00799-z.
316. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: Old questions and new insights. *Science (80- )* 2011;**332**:1519–23.
317. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ *et al.* Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;**115**:1343–51.

318. Lomonaco R, Ortiz-Lopez C, Orsak B *et al.* Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012;**55**:1389–97.
319. Liu W, Baker RD, Bhatia T *et al.* Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Life Sci* 2016;**73**:1969–87.
320. Browning JD, Horton JD, Browning JD *et al.* Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury Find the latest version : Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;**114**:147–52.
321. Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab* 2008;**19**:371–9.
322. Bugianesi E, Moscatiello S, Ciaravella MF *et al.* Insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des* 2010;**16**:1941–51.
323. Singh S, Allen AM, Wang Z *et al.* Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver versus Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta- analysis of Paired-Biopsy Studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;**13**:643–54.
324. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016;**65**:1038–48.
325. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? *Gastroenterology* 1998;**114**:842–5.
326. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010;**52**:1836–46.
327. Begrich K, Igoudjil A, Pessayre D *et al.* Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006;**6**:1–28.
328. Xu L, Nagata N, Ota T. Impact of glucoraphanin-mediated activation of nrf2 on non-alcoholic fatty liver disease with a focus on mitochondrial dysfunction. *Int J Mol Sci* 2019;**20**, DOI: 10.3390/ijms20235920.
329. Cortez-Pinto H, De Moura MC, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: From cell biology to clinical practice. *J Hepatol* 2006;**44**:197–208.
330. Mihm S. Danger-associated molecular patterns (DAMPs): Molecular triggers for sterile inflammation in the liver. *Int J Mol Sci* 2018;**19**:1–18.
331. Ashraf NU, Sheikh TA. Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radic Res* 2015;**49**:1405–18.
332. Puri P, Mirshahi F, Cheung O *et al.* Activation and Dysregulation of the Unfolded Protein Response in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2008;**134**:568–76.
333. Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* 2015;**239**:192–202.
334. Hrnčir T, Hrnčírova L, Kverka M *et al.* Gut Microbiota and NAFLD: Pathogenetic Mechanisms, Microbiota Signatures, and Therapeutic Interventions. *Microorganisms* 2021;**9**:957.
335. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013;**500**:541–6.

336. Arab JP, Martin-Mateos RM, Shah VH. Gut–liver axis, cirrhosis and portal hypertension: the chicken and the egg Juan. *Hepatol Int* 2018;**12**:24–33.
337. Zhang W, Wu Y, Mu D *et al*. Kupffer cells: Increasingly significant role in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2014;**13**:489–95.
338. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 2006;**26**:1175–86.
339. Grunhut J, Wang W, Aykut B *et al*. Macrophages in Nonalcoholic Steatohepatitis: Friend or Foe? *Eur Med journal Hepatol* 2018;**6**:100–9.
340. Kazankov K, Jørgensen SMD, Thomsen KL *et al*. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;**16**:145–59.
341. Mallat A, Lotersztajn S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 5. novel insights into liver fibrosis. *Am J Physiol - Cell Physiol* 2013;**305**, DOI: 10.1152/ajpcell.00230.2013.
342. Karlmark KR, Weiskirchen R, Zimmermann HW *et al*. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* 2009;**50**:261–74.
343. Seki E, Schwabe RF. Hepatic Inflammation and Fibrosis: Functional Links and Key Pathways. *Hepatology* 2015;**61**:1066–79.
344. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y *et al*. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008;**453**:314–21.
345. Xue ZF, Wu XM, Liu M. Hepatic regeneration and the epithelial to mesenchymal transition. *World J Gastroenterol* 2013;**19**:1380–6.
346. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP *et al*. Liver fibrosis and repair: Immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* 2014;**14**:181–94.
347. Xu R, Zhang Z, Wang FS. Liver fibrosis: Mechanisms of immune-mediated liver injury. *Cell Mol Immunol* 2012;**9**:296–301.
348. Fabregat I, Caballero-Díaz D. Transforming growth factor- $\beta$ -induced cell plasticity in liver fibrosis and hepatocarcinogenesis. *Front Oncol* 2018;**8**, DOI: 10.3389/fonc.2018.00357.
349. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;**371**:838–51.
350. Wake K. “Sternzellen” in the liver: Perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 1971;**132**:429–61.
351. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;**14**:397–411.
352. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol* 2013;**3**:1473–92.
353. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M *et al*. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 2007;**46**:955–75.
354. Seki E, De Minicis S, Österreicher CH *et al*. TLR4 enhances TGF- $\beta$  signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007;**13**:1324–32.
355. Giannelli G, Mikulits W, Dooley S *et al*. The rationale for targeting TGF- $\beta$  in chronic liver diseases. *Eur J Clin Invest* 2016;**46**:349–61.

356. Biernacka A, Dobaczewsk M, Frangogiannis NG. TGF- $\beta$  signaling in fibrosis. *Growth Factors* 2014;**29**:196–202.
357. Frangogiannis NG. Transforming growth factor- $\beta$  in tissue fibrosis. *J Exp Med* 2020;**217**:1–16.
358. Cayón A, Crespo J, Mayorga M *et al.* Increased expression of Ob-Rb and its relationship with the overexpression of TGF- $\beta$ 1 and the stage of fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006;**26**:1065–71.
359. Klein S, Mittendorfer B, Eagon JC *et al.* Gastric Bypass Surgery Improves Metabolic and Hepatic Abnormalities Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2006;**130**:1564–72.
360. Dooley S, Ten Dijke P. TGF- $\beta$  in progression of liver disease. *Cell Tissue Res* 2012;**347**:245–56.
361. Fabregat I, Moreno-Càceres J, Sánchez A *et al.* TGF- $\beta$  signalling and liver disease. *FEBS J* 2016;**283**:2219–32.
362. Yang L, Roh YS, Song J *et al.* Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice. *Hepatology* 2014;**59**:483–95.
363. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;**115**:209–18.
364. Schon H-T, Weiskirchen R. Immunomodulatory effects of transforming growth factor- $\beta$  in the liver. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;**3**:386–406.
365. Robertson IB, Rifkin DB. Regulation of the bioavailability of TGF- $\beta$  and TGF- $\beta$ -related proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016;**8**, DOI: 10.1101/cshperspect.a021907.
366. Heldin CH, Vanlandewijck M, Moustakas A. Regulation of EMT by TGF $\beta$  in cancer. *FEBS Lett* 2012;**586**:1959–70.
367. Massagué J, Chen Y-G. Controlling TGF- $\beta$  signaling. *Genes Dev* 2000;**14**:627–44.
368. Afrakhte M, Morén A, Jossan S *et al.* Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF- $\beta$  family members. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;**249**:505–11.
369. Morrison CD, Parvani JG, Schiemann WP. The Relevance of the TGF- $\beta$  Paradox to EMT-MET Programs Chevaun. *Cancer Lett* 2013;**341**:1–7.
370. Drabsch Y, Ten Dijke P. TGF- $\beta$  signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2012;**31**:553–68.
371. Liu Y, Liu H, Meyer C *et al.* Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-mediated connective tissue growth factor (CTGF) expression in hepatic stellate cells requires Stat3 signaling activation. *J Biol Chem* 2013;**288**:30708–19.
372. Meng F, Wang K, Aoyama T *et al.* IL-17 signaling in inflammatory cells, Kupffer cells and Hepatic Stellate cells exacerbates liver fibrosis. *Gastroenterology* 2013;**143**:765–76.
373. Crespo Yanguas S, Cogliati B, Willebrords J *et al.* Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol* 2016;**90**:1025–48.
374. Delire B, Stärkel P, Leclercq I. Animal models for fibrotic liver diseases: What we have, what we need, and what is under development. *J Clin Transl Hepatol* 2015;**3**:53–66.

375. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;**25**:319–33.
376. Scholten D, Trebicka J, Liedtke C *et al.* The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim* 2015;**49**:4–11.
377. Weber LWD, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003;**33**:105–36.
378. Niu L, Cui X, Qi Y *et al.* Involvement of TGF- $\beta$ 1/Smad3 Signaling in Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Mice. *PLoS One* 2016;**11**, DOI: 10.1371/journal.pone.0156090.
379. Abdel-Moneim AM, Al-Kahtani MA, El-Kersh MA *et al.* Free radical-scavenging, anti-inflammatory/anti-fibrotic and hepatoprotective actions of taurine and silymarin against CCl<sub>4</sub> induced rat liver damage. *PLoS One* 2015;**10**:1–16.
380. Svartberg J, Midtby M, Børnaa KH *et al.* The associations of age, lifestyle factors and chronic disease with testosterone in men: The Tromsø study. *Eur J Endocrinol* 2003;**149**:145–52.
381. Heckman MA, Weil J, de Mejia EG. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci* 2010;**75**:77–87.
382. Quan HY, Kim DY, Chung SH. Caffeine attenuates lipid accumulation via activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway in HepG2 cells. *BMB Rep* 2013;**46**:207–2012.
383. Leão TK, Ribeiro DL, Machado ART *et al.* Synephrine and caffeine combination promotes cytotoxicity, DNA damage and transcriptional modulation of apoptosis-related genes in human HepG2 cells. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2021;**868–869**, DOI: 10.1016/j.mrgentox.2021.503375.
384. Spryszyńska S, Smok-Pieniazek A, Ferlińska M *et al.* The influence of ATM, ATR, DNA-PK inhibitors on the cytotoxic and genotoxic effects of dibenzo[def,p]chrysene on human hepatocellular cancer cell line HepG2. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2015;**791**:12–24.
385. Zaharieva DP, Riddell MC. Caffeine and glucose homeostasis during rest and exercise in diabetes mellitus. *Appl Physiol Nutr Metab* 2013;**38**:813–22.
386. Kim HJ, Yoon BK, Park H *et al.* Caffeine inhibits adipogenesis through modulation of mitotic clonal expansion and the AKT/GSK3 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *BMB Rep* 2016;**49**:111–5.
387. Acheson KJ, Gremaud G, Meirim I *et al.* Metabolic effects of caffeine in humans: Lipid oxidation or futile cycling? *Am J Clin Nutr* 2004;**79**:40–6.
388. Arciero PJ, Gardner AW, Calles-Escandon J *et al.* Effects of caffeine ingestion on NE kinetics, fat oxidation, and energy expenditure in younger and older men. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 1995;**268**:192–8.
389. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 2001;**60**:329–39.
390. Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K *et al.* Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone* 2001;**28**:332–6.
391. Kempf K, Herder C, Erlund I *et al.* Effects of coffee consumption on subclinical



- inflammation and other risk factors for type 2 diabetes: A clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2010;**91**:950–7.
392. Kempf K, Kolb H, Gärtner B *et al*. Cardiometabolic effects of two coffee blends differing in content for major constituents in overweight adults: a randomized controlled trial. *Eur J Nutr* 2015;**54**:845–54.
393. Wedick NM, Brennan AM, Sun Q *et al*. Effects of caffeinated and decaffeinated coffee on biological risk factors for type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *Nutr J* 2011;**10**:1–9.
394. Williams CJ, Fargnoli JL, Hwang JJ *et al*. Coffee consumption is associated with higher plasma adiponectin concentrations in women with or without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2008;**31**:504–7.
395. Haidari F, Samadi M, Mohammadshahi M *et al*. Energy restriction combined with green coffee bean extract affects serum adipocytokines and the body composition in obese women. *Asia Pac J Clin Nutr* 2017;**26**:1048–54.
396. Ferré S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J Neurochem* 2008;**105**:1067–79.
397. Van Schaik L, Kettle C, Green R *et al*. Effects of Caffeine on Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Metabolic Homeostasis: A Review. *Front Neurosci* 2021;**15**:1–15.
398. Meriño M, Briones L, Palma V *et al*. Role of adenosine receptors in the adipocyte–macrophage interaction during obesity. *Endocrinol Diabetes y Nutr (English ed)* 2017;**64**:317–27.
399. Liu M, Liu F. Up- and down-regulation of adiponectin expression and multimerization: Mechanisms and therapeutic implication Meilian. *Biochimie* 2012;**94**:2126–30.
400. Fang H, Judd RL. Adiponectin regulation and function. *Compr Physiol* 2018;**8**:1031–63.
401. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N *et al*. Induction of Adiponectin, a Fat-Derived Antidiabetic and Antiatherogenic Factor, by Nuclear Receptors. *Diabetes* 2003;**52**:1655–63.
402. Wang A, Liu M, Liu X *et al*. Up-regulation of adiponectin by resveratrol: The essential roles of the Akt/FOXO1 and amp-activated protein kinase signaling pathways and DsbA-L. *J Biol Chem* 2011;**286**:60–6.
403. Ioannilli L, Ciccarone F, Ciriolo MR. Adipose Tissue and FoxO1: Bridging Physiology and Mechanisms Laura. *Cells* 2020;**9**.
404. Rena G, Prescott AR, Guo S *et al*. Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *Biochem J* 2001;**354**:605–12.
405. Aoki M, Jiang H, Vogt PK. Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:13613–7.
406. Alvarez-Sala LA, Núñez-Cortés JM, de Oya M. [Mediterranean diet in Spain. Legend or reality? (I). Study of 7 countries. Various elements of the Mediterranean diet: olive oil and red wine]. *Rev Clínica Española* 1996;**196**:548–56.
407. Martínez-González MA, Gea A, Ruiz-Canela M. The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health: A Critical Review. *Circ Res* 2019;**124**:779–98.

408. Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C *et al.* The association of Mediterranean diet with lower risk of acute coronary syndromes in hypertensive subjects. *Int J Cardiol* 2002;**82**:141–7.
409. Tektonidis TG, Åkesson A, Gigante B *et al.* A Mediterranean diet and risk of myocardial infarction, heart failure and stroke: A population-based cohort study. *Atherosclerosis* 2015;**243**:93–8.
410. Ros E, Martínez-González MA, Estruch R *et al.* Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED Study. *Adv Nutr* 2014;**5**:330S-336S.
411. Opie LH, Lecour S. The red wine hypothesis: From concepts to protective signalling molecules. *Eur Heart J* 2007;**28**:1683–93.
412. Renaud S, Lorigeril M De. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992:1523–6.
413. Leger ASS, Cochrane AL, Moore F. Factors Associated With Cardiac Mortality in Developed Countries With Particular Reference To the Consumption of Wine. *Lancet* 1979;**313**:1017–20.
414. Tresserra-Rimbau A, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM *et al.* Moderate red wine consumption is associated with a lower prevalence of the metabolic syndrome in the PREDIMED population. *Br J Nutr* 2015;**113**:S121–30.
415. Singh AP, Singh R, Verma SS *et al.* Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies. *Med Res Rev* 2019;**39**:1851–91.
416. Karim R, Hodis HN, Stanczyk FZ *et al.* Relationship between serum levels of sex hormones and progression of subclinical atherosclerosis in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**:131–8.
417. Akbari M, Tamtaji OR, Lankarani KB *et al.* The effects of resveratrol on lipid profiles and liver enzymes in patients with metabolic syndrome and related disorders: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Lipids Health Dis* 2020;**19**:25.
418. Simental-Mendía LE, Guerrero-Romero F. Effect of resveratrol supplementation on lipid profile in subjects with dyslipidemia: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition* 2019;**58**:7–10.
419. da Luz PL, Coimbra S, Favarato D *et al.* Coronary artery plaque burden and calcium scores in healthy men adhering to long-term wine drinking or alcohol abstinence. *Brazilian J Med Biol Res* 2014;**47**:697–705.
420. Marques-Vidal P, Bochud M, Paccaud F *et al.* No interaction between alcohol consumption and HDL-related genes on HDL cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2010;**211**:551–7.
421. Park H, Kim K. Association of alcohol consumption with lipid profile in hypertensive men. *Alcohol Alcohol* 2012;**47**:282–7.
422. Ronksley PE, Brien SE, Turner BJ *et al.* Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Bmj* 2011;**342**:479.
423. Shufelt C, Merz CNB, Yang Y *et al.* Red Versus White Wine as a Nutritional Aromatase Inhibitor in Premenopausal Women: A Pilot Study. *J Women's Heal* 2012;**21**:281–4.

424. Chow HHS, Garland LL, Heckman-Stoddard BM *et al.* A pilot clinical study of resveratrol in postmenopausal women with high body mass index: Effects on systemic sex steroid hormones. *J Transl Med* 2014;**12**:1–7.
425. Banaszewska B, Wrotyńska-Barczyńska J, Spaczynski RZ *et al.* Effects of resveratrol on polycystic ovary syndrome: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;**101**:4322–8.
426. Walle T. Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2011;**1215**:9–15.
427. Qasem RJ. The estrogenic activity of resveratrol: a comprehensive review of in vitro and in vivo evidence and the potential for endocrine disruption. *Crit Rev Toxicol* 2020;**50**:439–62.
428. Bavaresco L, Fregoni C, Cantù E *et al.* Stilbene compounds: from the grapevine to wine. *Drugs Exp Clin Res* 1999;**25**:57–63.
429. Kjær TN, Ornstrup MJ, Poulsen MM *et al.* Resveratrol reduces the levels of circulating androgen precursors but has no effect on, testosterone, dihydrotestosterone, PSA levels or prostate volume. A 4-month randomised trial in middle-aged men. *Prostate* 2015;**75**:1255–63.
430. Lamba V, Lamba J, Yasuda K *et al.* Hepatic CYP2B6 Expression: Gender and Ethnic Differences and Relationship to CYP2B6 Genotype and CAR (Constitutive Androstane Receptor) Expression. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;**307**:906–22.
431. Hernandez JP, Mota LC, Huang W *et al.* Sexually dimorphic regulation and induction of P450s by the constitutive androstane receptor (CAR). *Toxicology* 2009;**256**:53–64.
432. Peter A, Kantartzis K, Machann J *et al.* Relationships of circulating sex hormone-binding globulin with metabolic traits in humans. *Diabetes* 2010;**59**:3167–73.
433. Schuppan D. Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015;**39**:S51–9.
434. Shrestha N, Chand L, Han MK *et al.* Glutamine inhibits CCl4 induced liver fibrosis in mice and TGF- $\beta$ 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in mouse hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 2016;**93**:129–37.
435. Laping NJ, Grygielko E, Mathur A *et al.* Inhibition of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF- $\beta$  type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* 2002;**62**:58–64.
436. Senarath-Yapa K, Li S, Walmsley GG *et al.* Small Molecule Inhibition of Transforming Growth Factor Beta Signaling Enables the Endogenous Regenerative Potential of the Mammalian Calvarium. *Tissue Eng - Part A* 2016;**22**:707–20.
437. Pasche B. Role of Transforming Growth Factor Beta in Cancer. *J Cell Physiol* 2001;**186**:153–68.
438. Argemi J, Latasa MU, Atkinson SR *et al.* Defective HNF4 $\alpha$ -dependent gene expression as a driver of hepatocellular failure in alcoholic hepatitis. *Nat Commun* 2019;**10**, DOI: 10.1038/s41467-019-11004-3.
439. Lin E, Kuo PH, Liu YL *et al.* Transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway-associated genes SMAD2 and TGFBR2 are implicated in metabolic syndrome in a Taiwanese population. *Sci Rep* 2017;**7**:1–8.
440. Barrett-Connor E, Khaw K-T, Yen SSC. Endogenous Sex Hormone levels in older adult men with diabetes mellitus. *Am J Epidemiol* 1990;**132**:895–901.

441. Hua X, Sun Y, Zhong Y *et al.* Low serum sex hormone-binding globulin is associated with nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014;**80**:877–83.
442. Cai J, Zhang XJ, Ji YX *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pandemic Fuels the Upsurge in Cardiovascular Diseases. *Circ Res* 2020;**126**:679–704.
443. Liu HH, Cao YX, Jin JL *et al.* Liver fibrosis scoring systems as novel tools for predicting cardiovascular outcomes in patients following elective percutaneous coronary intervention. *J Am Heart Assoc* 2021;**10**:1–10.
444. Zhou J, Bai L, Zhang XJ *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiac Remodeling Risk: Pathophysiological Mechanisms and Clinical Implications. *Hepatology* 2021;**74**:2839–47.





